



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS
REPLICATIVOS DEL TOROVIRUS
EQUINO BEV**

TESIS DOCTORAL

GINÉS FRANCISCO ÁVILA PÉREZ

Madrid, Septiembre de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS
REPLICATIVOS DEL TOROVIRUS
EQUINO BEV**

Memoria presentada por Ginés Francisco Ávila Pérez
para optar al grado de Doctor en Biociencias por la
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Septiembre de 2015



El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) bajo la dirección de la Dra. Dolores Rodríguez Aguirre.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Madrid, Septiembre de 2015

Fdo. Dolores Rodríguez Aguirre

AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, tras años de trabajo y unos meses de intensa escritura, no quisiera terminar esta etapa sin dar las gracias a todas y cada una de las personas que durante este tiempo han cooperado de algún modo a la elaboración de esta tesis doctoral.

En primer lugar quisiera dar las gracias a mi directora de tesis, la Dr. Dolores Rodríguez Aguirre, por darme la oportunidad de poder realizar la tesis doctoral en el laboratorio que dirige. Gracias Lolo por ser como eres, por guiarme durante toda la tesis y por permitirme en cierto modo madurar como científico al darme libertad para poder tomar decisiones. Gracias por ser una directora que fomenta el aprendizaje, gracias por todos los cursos externos con cuenta a proyecto o las participaciones a congresos que me has permitido realizar, te lo agradezco porque de ello he aprendido mucho. Pero sobre todo quiero agradecerte la gran persona que eres, gracias por mimarnos como si fuéramos tus hijos, por traernos galletitas para que nos sintiéramos cómodos y por tantos y tantos cafés y zumos que hemos compartido hablando de ciencia entre otras cosas.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio 113 que me han acompañado durante este tiempo, Jaime, Ana Maestre, Miriam, Laura, Henar, Julio, Gliselle, Susana y Lili por toda la ayuda que me disteis. Especialmente quiero agradecer a Jaime la paciencia que demostró enseñándome. A Susana por ser la técnico que todo becario quiere a su lado. A Gliselle por ser única, el laboratorio sin ti no es lo mismo. No voy a olvidar jamás tus pisos de geles, eres una trabajadora incansable, sigue así y no te rindas. Lili, ¡te quedas al mando!, gracias por dedicarnos tu sonrisa todas las mañanas.

A nuestros compis del grupo de Marta Nieto, Linnea, Fer y Carlos gracias por las horas de relax durante la comida y el día a día del laboratorio, sin vosotros sería muy aburrido. Dj Carlos, aunque te fastidio tus sesiones musicales, eres un fenómeno. Tu llegada al laboratorio propició la alegría, eres de esas personas que transmites entusiasmo, de mayor me quiero parecer a ti. Nunca olvidaré nuestras bromas a Susana con nieve carbónica, ni tus sesiones musicales de lo más variopinto.

Al grupo de Paco Rodríguez: Fernando, Ana, Antonio, Diego, Romy, Gema e Idoia, por ser nuestro almacén por las tardes. Gracias por los consejos y por la crítica constructiva que me han aportado los seminarios de grupo a lo largo de estos años.

También quiero dar las gracias al resto de compañeros del departamento de Biología molecular y celular del CNB, gracias por esos pequeños desmadres en las cenas de navidad. Así como al resto de personal del centro que forma el CNB, el cual durante este tiempo ha sido parte de mi casa.

Un especial agradecimiento al Dr. Raoul de Groot por acogerme unos meses en su laboratorio de la universidad de Utrecht (Países Bajos) para realizar una estancia. Solo puedo tener palabras de agradecimiento para todo el departamento de enfermedades infecciosas e inmunología de la facultad de veterinaria, estuve poco tiempo, pero cada uno de sus miembros me trató como uno más y me ayudó a adaptarme y a llevar a cabo mis estudios de la mejor forma. Aunque no obtuve grandes resultados, la experiencia fue única, y aprendí una buena lección científica, nunca hay controles de menos.

No quisiera dejar de agradecer a todos los profesionales con los que he cooperado y sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible. Gracias especiales a Maite Rejas, y a todo el personal del servicio de Microscopía electrónica del CBMSO-CSIC por ser grandes profesionales y estar siempre disponibles para resolver cualquier problema o duda. Gracias a Milagros por esos cortes seriados tan bonitos, por involucrarte y lograr que terminaran saliendo. Gracias también al grupo de Pepe Carrascosa del CNB, especialmente a Javier Chichón por las sesiones de tomografía tan entretenidas. A José Jesús Fernández del CNB por las largas horas de debate sobre las reconstrucciones, por las clases magistrales que me diste sobre el programa reconstruct, y por las reconstrucciones de los tomogramas que nos has generado. También quiero dar un especial agradecimiento al servicio de microscopía confocal del CNB, y sobre todo a Sylvia, por implicarse en cada proyecto como si fuera suyo.

En el plano personal quiero dar las gracias a mis compañeros de Granada por trasmitirme el amor por la ciencia. Por los buenos años que pasamos juntos durante la carrera y por los que nos quedan que pasar. Son pocas las oportunidades que tenemos de vernos pero en las que lo conseguimos es como si el tiempo no pasara. ¡Sois grandes AMIGOS!. Especialmente a Fran y Marta por ser los primeros en desembarcar en Madrid y animarme a hacer lo mismo. Fran siempre has sido un referente para mí, gracias por todo y por estar siempre que te necesito.

A mis padres, porque sin su apoyo incondicional y sus sacrificios esto no hubiera sido posible. A mi hermana Sole y a esa cosita pequeña que me ha regalado. A mi nueva familia política, por tratarme como a un hijo más, por darme cariño y apoyo en los momentos difíciles. A Mari, mi madre de Madrid, gracias por cuidarnos y estar atenta a nosotros. A José María, por ser el hermano que nunca tuve y tratarme como tal. A María y Andres, por ser algo más que amigos, gracias por todos y cada uno de los momentos que hemos pasado juntos.

Y como no, a la persona que más ha sufrido esta tesis, a ti Bárbara, gracias por ser como eres, por quererme y estar a mi lado en cada momento, por darme apoyo, por aguantar sin rechistar mis sábados en el laboratorio o mis frustraciones por un mal resultado, por darme el empujón definitivo para irme de estancia a Holanda aunque te tocara a ti planificar toda nuestra boda, en definitiva, una parte de esta tesis claramente es tuya.

GRACIAS

A mis padres y a Bárbara



ABREVIATURAS

| | | | |
|------------|--|--------------------|---|
| 3-MA | 3-Metiladenina. | MHV | Coronavirus causante de la hepatitis del ratón. |
| ADPR | Adenosina difosfato ribosa 1' '-fosofatasa. | M ^{pro} | Proteasa principal. |
| ActD | Actinomicina D. | mTORC1 | Complejo quinasa diana de la rapamicina de mamíferos. |
| Atg | Genes relacionados con autofagia. | MW | Red membranosa. |
| BEV | Torovirus equino Berne virus. | N | Proteína de la nucleocápsida. |
| BMV | Virus del mosaico del bromo. | N-terminal | Extremo amino terminal. |
| BrU | 5-Bromouridina. | NBR1 | <i>Neighbor of BRCA1 gene</i> . |
| BRV | Torovirus bovino Breda virus. | NH ₄ Cl | Cloruro de amonio. |
| BSA | Albumina de suero bovino. | NTR | Regiones no traducidas del genoma. |
| BToV | Torovirus bovino. | ORF | Marco de lectura abierto. |
| C-terminal | Extremo carboxilo terminal. | p62 | Proteína adaptadora. |
| CMs | Membranas enmarañadas. | PB1 | Dominio de interacción proteína-proteína (<i>Phox and Bem1p domain</i>). |
| CPD | Fosfodiesterasa cíclica. | PBS | Solución de tampón fosfato. |
| CVB3 | Cosackievirus B3. | PDI | Proteína disulfuro isomerasa. |
| DENV | Virus del Dengue. | PE | Fosfatidiletanolamina. |
| DMEM | Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco. | PERK | <i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i> . |
| DMV | Vesícula de doble membrana. | PFA | Paraformaldehído. |
| dsRNA | RNA de doble cadena. | PI3K | Fosfoinositol 3-fosfato quinasa. |
| DTE | Elemento de transcripción discontinua. | PI3P | Fosfoinositol 3-fosfato. |
| EAA1 | Antígeno 1 del endosoma temprano. | PKR | <i>Protein kinase RNA-dependent</i> . |
| EAV | Arterivirus causante de la arteritis equina. | PLP | Proteasa tipo Papaina. |
| EBSS | Medio de ayuno (<i>Earle's balanced salt solution</i>). | pp1a | Poliproteína 1a. |
| eIF2 | Factor de iniciación eucariótico 2. | pp1ab | Poliproteína 1ab. |
| ERAD | RE asociado a degradación. | PRRSV | Arterivirus causante del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo. |
| ERGIC | Compartimento intermedio entre el RE y el aparato de Golgi. | PToV | Torovirus porcino. |
| EToV | Torovirus equino. | RdRp | RNA polimerasa dependiente de RNA. |
| FCS | Suero fetal bovino. | RE | Retículo endoplásmico. |
| FHV | <i>Flock house virus</i> . | RTC | Complejos de replicación y transcripción. |
| HCQ | Hidroxiclороquina. | RUBV | Virus de la rubeola. |
| HCV | Virus de la hepatitis C. | RVN | Red retículo-vesicular. |
| HE | Proteína hemaglutinina esterasa. | S | Proteína de la espícula. |
| Hel | Helicasa. | S1R | Receptor Sigma1. |
| HIV-1 | Virus de la inmunodeficiencia humana. | SARS-CoV | Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. |
| HPF-FS | Fijación a alta presión seguida de criosustitución. | sgRNA | RNA subgenómico. |
| HPRT1 | Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1. | SMV | Vesícula de membrana simple. |
| HRT-18 | Línea celular humana procedente de un adenocarcinoma rectal. | ssRNA- | RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. |
| HToV | Torovirus humano. | ssRNA+ | RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. |
| HVS-1 | Herpesvirus 1. | TGN46 | Proteína 46 de la red trans Golgi. |
| IBV | Virus causante de la bronquitis aviar. | TLRs | <i>Toll-like receptors</i> . |
| ICTV | Comité internacional de taxonomía de virus. | TM | Región transmembrana. |
| Lamp | Proteína lisosomal asociada a la membrana. | TP | Regiones Terminadoras/Promotoras. |
| LB | Medio de cultivo Luria Broth. | UBA | Dominio de asociación a ubiquitina. |
| LC3 | <i>Microtubule-associated protein 1 light</i> . | ULK | <i>UNC-51-like kinase</i> . |
| LIR | Dominio de interacción con LC3. | VSV | Virus de la estomatitis vesicular. |
| M | Proteína de Membrana. | Vps34 | Fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III (<i>vacuolar protein sorting 34</i>). |
| MAMs | Membranas del RE asociadas a mitocondrias. | Wn | Wortmanina. |
| MERS-CoV | Coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo de Oriente Medio. | WNV | <i>West Nile virus</i> . |
| | | XendoU | Endoribonucleasa específica de poli-U. |
| | | ZBD | Dominio de unión a zinc. |



ÍNDICE

| | |
|----------------|-----------|
| SUMMARY | 29 |
|----------------|-----------|

| | |
|---------------------|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 33 |
|---------------------|-----------|

| | |
|---|-----------|
| 1. Características de los torovirus | 35 |
| 1.1 Clasificación taxonómica | 35 |
| 1.2 Morfología y estructura de la partícula viral | 36 |
| 1.3 Organización genómica y replicación | 36 |
| 1.4 Proteínas..... | 39 |
| 1.4.1 Proteínas no estructurales | 39 |
| 1.4.2 Proteínas estructurales..... | 41 |
| 1.5 Ciclo vital de los torovirus..... | 41 |
| 1.6 Epidemiología y patogenia de los torovirus | 42 |
| 2. Factorías de replicación | 43 |
| 2.1 Factorías de replicación inducidas por los nidovirus | 45 |
| 2.2 Papel de los complejos de replicación en la formación de las factorías virales de los nidovirus | 46 |
| 3. Autofagia | 47 |
| 3.1 Mecanismos moleculares de la autofagia | 47 |
| 3.1.1 Iniciación | 47 |
| 3.1.2 Nucleación..... | 47 |
| 3.1.3 Expansión | 48 |
| 3.1.4 Fusión y degradación..... | 50 |
| 3.2 Autofagia selectiva | 50 |
| 3.3 Virus y autofagia | 51 |
| 3.3.1 Mecanismos de inducción viral de la autofagia..... | 51 |
| 3.3.2 Mecanismos de bloqueo de la autofagia por los virus | 52 |
| 3.3.3 Efecto antiviral de la autofagia. Regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa | 52 |
| 3.3.4 Efecto proviral de la autofagia | 52 |
| 3.4 Nidovirus y autofagia | 52 |

| | |
|------------------|-----------|
| OBJETIVOS | 55 |
|------------------|-----------|

MATERIALES Y MÉTODOS

59

1. Material biológico

61

| | |
|-------------------------------|----|
| 1.1 Células eucariotas..... | 61 |
| 1.2 Células procariotas | 61 |
| 1.3 Virus..... | 61 |

2. Reactivos

62

| | |
|---------------------------|----|
| 2.1 Plásmidos..... | 62 |
| 2.2 Anticuerpos | 64 |
| 2.3 Otros reactivos | 66 |

3. Metodología

66

| | |
|--|----|
| 3.1 Infección | 66 |
| 3.1.1 Infección en medio líquido | 66 |
| 3.1.2 Infección en medio sólido. Titulación por ensayo de formación de placas de lisis. | 66 |
| 3.2 Cuantificación de RNA viral | 67 |
| 3.2.1 Extracción de RNA | 67 |
| 3.2.2 RT-PCR cuantitativa..... | 67 |
| 3.3 SDS-PAGE e inmunoblot | 67 |
| 3.3.1 Análisis cuantitativo de proteínas | 68 |
| 3.4 Producción de sueros frente proteínas del complejo de la replicasa de BEV | 68 |
| 3.4.1 Generación de los plásmidos para la expresión en bacterias..... | 68 |
| 3.4.2 Expresión y purificación del antígeno..... | 69 |
| 3.4.3 Obtención de los sueros específicos..... | 70 |
| 3.4.5 ELISA..... | 70 |
| 3.5 Transfección en células equinas | 70 |
| 3.6 Fraccionamiento subcelular | 71 |
| 3.7 Microscopia de fluorescencia | 71 |
| 3.7.1 Inmunofluorescencia..... | 71 |
| 3.7.2 Tinción con sondas fluorescentes..... | 72 |
| 3.7.3 Marcaje con 5-Bromouridina..... | 72 |
| 3.7.4 Expresión de proteínas fluorescentes | 72 |
| 3.7.5 Cuantificación del grado de colocalización..... | 72 |
| 3.7.6 Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de confocal..... | 72 |

| | |
|---|----|
| 3.8 Microscopía electrónica | 73 |
| 3.8.1 Inclusión convencional en resina epoxi TAAB-812..... | 73 |
| 3.8.2 Inclusión de monocapas celulares en resina epoxi TAAB-812 | 73 |
| 3.8.2.1 Cortes seriados..... | 74 |
| 3.8.3 Criosustitución..... | 74 |
| 3.8.4 Criosecciones..... | 74 |
| 3.8.4.1 Inmunomarcado con oro coloidal en crio secciones..... | 75 |
| 3.8.5 Tomografía y reconstrucción tridimensional | 76 |
| 3.9 Generación de células estables que expresan la proteína de fusión GFP-LC3..... | 76 |
| 3.9.1 Cuantificación de autofagosomas | 76 |
| 3.10 Silenciamiento génico: RNA de interferencia | 77 |
| 3.10.1 Silenciamiento utilizando vectores retrovirales..... | 77 |
| 3.10.1.1 Generación de pseudopartículas retrovirales para el silenciamiento de Beclin 1..... | 77 |
| 3.10.1.2 Obtención de células equinas silenciadas de forma estable para Beclin 1 utilizando pseudopartículas retrovirales | 77 |
| 3.10.2 Silenciamiento utilizando vectores lentivirales | 77 |
| 3.10.2.1 Generación de pseudopartículas lentivirales..... | 77 |
| 3.10.2.2 Titulación de pseudopartículas lentivirales..... | 78 |
| 3.10.2.3 Obtención de células equinas silenciadas de forma estable para Beclin 1 y Atg4B utilizando pseudopartículas lentivirales | 78 |
| 3.10.2.4 Silenciamiento de LC3B en células equinas utilizando partículas lentivirales | 78 |

RESULTADOS

81

| | |
|--|----|
| I. Complejos de replicación y transcripción de los torovirus: localización intracelular y origen de las membranas implicadas | 83 |
| 1. Obtención de sueros específicos frente a las proteínas no estructurales (nsps) de BEV | 83 |
| 1.1 Producción..... | 83 |
| 1.2 Caracterización | 84 |
| 2. Formación de DMVs en las células infectadas con BEV | 86 |

| | |
|---|----------------|
| 3. Localización de los complejos de replicación y transcripción (RTC) de BEV | 88 |
| 3.1 Distribución de las proteínas virales que forman los RTCs de BEV | 88 |
| 3.2 Colocalización entre las proteínas virales que forman los RTCs de BEV | 91 |
| 3.3 Localización intracelular del RNA viral involucrado en la replicación y transcripción de BEV | 92 |
| 4. La replicación y la transcripción en BEV está asociada a las DMVs | 98 |
| 5. Origen membranoso de las DMVs inducidas por BEV | 99 |
| 6. Formación de DMVs en células infectadas con el torovirus bovino Aichi | 101 |
| II. Biogénesis y estructura de las factorías de replicación producidas por BEV | 106 |
| 7. Estructuras membranosas inducidas por la replicación de BEV a lo largo de la infección | 106 |
| 8. Estudio tridimensional de las factorías de replicación inducidas por BEV | 107 |
| 8.1 Estudio 3D utilizando cortes seriados..... | 108 |
| 8.2 Estudio 3D utilizando tomografía electrónica..... | 110 |
| III. Papel de la ruta autofágica en la infección de los los torovirus | 120 |
| 9. Formación de autofagosomas en las células infectadas con BEV | 120 |
| 10. Efectos de la modulación farmacológica de la ruta autofágica sobre la infección de BEV | 122 |
| 11. Efecto del silenciamiento de proteínas clave de la ruta autofágica sobre la infección de BEV | 124 |
| 11.1 Efecto del silenciamiento de Beclin1 | 124 |
| 11.2 Efecto del silenciamiento de Atg4B | 125 |
| 11.3 Efecto del silenciamiento de LC3B..... | 125 |
| 12. Análisis del flujo autofágico durante la infección con BEV | 127 |
| 12.1 Estado del flujo autofágico durante la infección con BEV..... | 127 |
| 12.2 Papel del flujo autofágico durante la infección con BEV..... | 129 |
| 13. BEV induce una autofagia selectiva | 130 |

DISCUSIÓN

135

1. Caracterización de los RTCs de los torovirus

137

- 1.1 Presencia de DMVs en las células infectadas con BEV..... 137
- 1.2 Relación entre las DMVs y los RTCs de BEV 138
- 1.3 Los RTCs están separados del sitio de ensamblaje viral 140
- 1.4 Origen de las membranas asociadas a los RTCs..... 141
- 1.5 Caracterización de los RTCs del torovirus bovino Aichi 142

2. Biogénesis y estructura de la RVN

143

- 2.1 Estructuras membranosas inducidas por la replicación de BEV 143
- 2.2 BEV induce la formación de una red reticulovesicular 144
- 2.3 ¿BEV induce la formación de verdaderas esférulas? 145
- 2.4 ¿Las DMVs son estructura abiertas?..... 145
- 2.5 Modelo de formación de la RVN de BEV 146

3. Estudio de la autofagia inducida por BEV

146

- 3.1 BEV induce la activación de la ruta autofágica 146
- 3.2 La modulación de la ruta autofágica no causa efecto sobre la infección de BEV 147
- 3.3 ¿Qué papel cumple la ruta autofágica en la infección con BEV? 147

CONCLUSIONES

151

REFERENCIAS

155

ÍNDICE DE ESQUEMAS

| | |
|--|-----|
| 1. Modelo morfológico de la partícula viral de torovirus | 36 |
| 2. Organización y expresión del genoma de los torovirus | 37 |
| 3. Proteínas no estructurales | 39 |
| 4. Modelos de factorías de replicación viral en los virus ssRNA+ | 44 |
| 5. Ruta autofágica | 49 |
| 6. Autofagia selectiva | 50 |
| 7. Modelo propuesto de formación de la red reticulovesicular | 119 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| 1. Purificación de las proteínas recombinantes RdRp-Nt y Hel de BEV | 83 |
| 2. Caracterización de los sueros obtenidos frente a las nsps M ^{pro} , RdRp-Nt y Hel de BEV | 85 |
| 3. Análisis ultraestructural de células E.Derm infectadas con BEV | 87 |
| 4. Análisis ultraestructural de células humanas MRC5 infectadas con BEV | 89 |
| 5. Análisis ultraestructural de las DMVs inducidas por BEV en secciones de célula tratadas mediante criosustitución o en criocortes | 89 |
| 6. Distribución de las proteínas virales que forman los RTC de BEV | 90 |
| 7. Análisis de colocalización entre las proteínas virales que forman los RTC de BEV | 92 |
| 8. Localización y distribución del dsRNA viral | 94 |
| 9. Ensayo de colocalización entre las proteínas virales implicadas en replicación y el dsRNA | 95 |
| 10. Localización y distribución del RNA viral de nueva síntesis | 97 |
| 11. El RNA de nueva síntesis presenta una colocación parcial con la proteína estructural M | 99 |
| 12. Relación entre la formación de DMVs y los RTCs de BEV | 100 |
| 13. Reconstrucción tridimensional de las imágenes de microscopía confocal | 101 |
| 14. Origen de las membranas de las DMVs inducidas por BEV | 102 |
| 15. Caracterización de los RTCs del torovirus bovino Aichi | 104 |
| 16. Análisis ultraestructural de las factorías de replicación inducidas por BEV a lo largo de la infección | 108 |
| 17. Estructuras membranosas relacionadas con las DMVs generadas a largo de la infección con BEV | 109 |
| 18. Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 6 y 10 hpi utilizando cortes seriados de 70 nm de grosor | 111 |

| | |
|---|-----|
| 19. Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 6 hpi utilizando cortes seriados de 50 nm de grosor..... | 112 |
| 20. Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 16 hpi utilizando cortes seriados de 50 nm de grosor..... | 113 |
| 21. Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 6 hpi utilizando tomografía..... | 115 |
| 22. Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 10 hpi utilizando tomografía..... | 116 |
| 23. Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 16 hpi utilizando tomografía..... | 117 |
| 24. Las DMVs se conectan a través de la membrana externa | 118 |
| 25. Análisis de la presencia de poros en las DMVs..... | 118 |
| 26. Análisis del origen de las membranas de las DMVs: Autofagosomas..... | 121 |
| 27. Análisis del estado de lipidación de LC3 en células infectadas con BEV..... | 122 |
| 28. Redistribución de la proteína GFP-LC3B en células infectadas con BEV | 123 |
| 29. Efecto de la modulación farmacológica de la ruta autofágica sobre la infección de BEV... | 125 |
| 30. Efecto del silenciamiento de Beclin1 o Atg4B sobre la infección de BEV | 126 |
| 31. Efecto del silenciamiento de LC3B sobre la infección de BEV..... | 128 |
| 32. Estado del flujo autofágico durante la infección con BEV | 129 |
| 33. Efecto del bloqueo del flujo autofágico durante el periodo de máxima replicación de BEV | 131 |
| 34. Efecto del bloqueo del flujo autofágico sobre BEV a tiempos tardíos de infección | 132 |
| 35. BEV induce autofagia selectiva..... | 133 |



SUMMARY

Summary

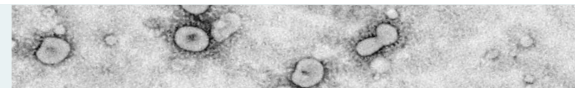
Plus-stranded RNA viruses replicate in the cytosol of infected cells, in membrane-bound replication complexes containing the replicase proteins, the viral RNA and host proteins. The formation of the replication and transcription complexes (RTCs) through the rearrangement of cellular membranes is currently being actively studied for viruses belonging to different viral families. In this work we identified double membrane vesicles (DMVs) in the cytoplasm of cells infected with the equine torovirus Berne virus (BEV), the prototype member of the *Torovirus* genus (*Coronaviridae* Family, *Nidovirales* Order). Using confocal microscopy and transmission electron microscopy we observed a close relationship between the RTCs and the DMVs of BEV. The examination of BEV infected cells revealed that the replicase proteins colocalized with each other and with newly synthesized RNA, and were associated to the membrane rearrangement induced by BEV. However, the dsRNA, an intermediate of viral replication, was exclusively limited to the interior of DMVs. Also, an in-depth ultrastructural analysis of cells infected with BEV was performed to characterize the architecture of torovirus replication factories and to learn about their biogenesis during the infection. Analysis by conventional transmission electron microscopy suggested that the DMVs form a reticulovesicular network (RVN) resembling those described for the related severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and the equine arteritis virus (EAV). Using serial sectioning and electron tomography we confirmed the formation of a RVN in BEV infected cells, where the DMVs outer membranes are interconnected with each other and with the ER. Like in EAV, convoluted membranes were not observed in the RVNs. However, we observed paired membranes lacking luminal space, which are connected with the DMVs, and likely represent early structures that will evolve to give rise to DMVs. Interestingly, curled membranes resembling the spherules described in IBV were observed at late time post-infection in BEV-infected cells, however, after careful examination of the tomograms we concluded that they are not true spherules, but aberrant structures arising late on the DMV formation. This work complements the knowledge about the membrane rearrangements promoted by nidovirus infection, and all this taken together indicates that the nidoviruses use a similar strategy to establish their membranous replication factories.

On the other hand, recent studies suggest that some positive-stranded RNA viruses exploit the autophagy pathway to facilitate their own replication. We demonstrated that BEV induces autophagy, with an active flux, in the infected cells at late times post-infection. However, the autophagy induction by nutrient deprivation, or its inhibition by pharmacological treatment with inhibitors of autophagosome formation or agents that block the autophagosome degradation, does not produce changes in BEV replication. In the same way, the replication of BEV was not affected in autophagy deficient cells lacking Beclin-1 or LC3B. Overall, our results suggest that the autophagy pathway is activated during BEV infection at late time post-infection, but this activation is not necessary for the viral replication.



OI

INTRODUCCIÓN



1. Características de los torovirus

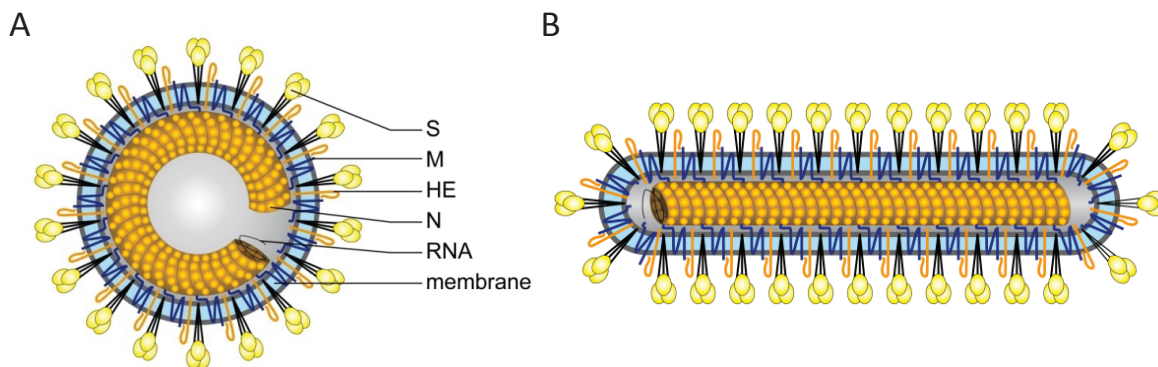
1.1 Clasificación taxonómica

Los torovirus son virus con envuelta que tienen un genoma de RNA no segmentado, de cadena sencilla y polaridad positiva (ssRNA+), y están clasificados por el Comité Internacional de Taxonomía (ICTV) dentro del orden *Nidovirales*. Actualmente, el orden *Nidovirales* está compuesto por cuatro familias: *Arteriviridae* formada por virus que infectan mamíferos, agrupados en un único género, *Arterivirus*, siendo el virus de la arteritis equina (EAV) el miembro prototipo; la familia *Roniviridae* formada por virus que infectan crustáceos, y que consta únicamente del género *Okavirus*; la familia *Mesoniviridae* (Lauber y col., 2012), que incluye diferentes nidovirus de mosquitos dentro del género *Alphamesonivirus*; y la familia *Coronaviridae* que incluye dos subfamilias: *Coronavirinae* y *Torovirinae*. A su vez la subfamilia *Coronavirinae* incluye los géneros *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* y *Deltacoronavirus*. Los miembros del género *Betacoronavirus* han sido los más estudiados a nivel molecular, destacando el virus de la hepatitis del ratón (MHV) y el virus causante del síndrome severo respiratorio (SARS-CoV). Además a este género pertenece el virus causante del reciente brote respiratorio agudo de Oriente Próximo o MERS-CoV. Los coronavirus humanos NL65 (HCoV-NL65) o el 229E (HCoV-229E) son miembros destacados del género *Alphacoronavirus*, y el virus de la bronquitis infecciosa aviar (IBV) lo es del género *Gammacoronavirus*. A su vez, el género *Deltacoronavirus* engloba coronavirus emergentes de aves y cerdos. Por su parte la subfamilia *Torovirinae* está compuesta por el género *Torovirus* y el género *Bafinivirus* (Schutze y col., 2006) que incluye nidovirus de peces. Recientemente se ha identificado la presencia de nidovirus en reptiles, concretamente en serpientes pitón, con un genoma de 33,5 kb siendo el genoma RNA de mayor tamaño conocido hasta ahora, y

según los análisis filogenéticos podría formar un nuevo género dentro de la subfamilia *Torovirinae* (Stenglein y col., 2014).

Dentro del género *Torovirus* se han descrito 4 especies: El torovirus equino (EToV), torovirus bovino (BToV), torovirus porcino (PToV) y torovirus humano (HToV). El aislado Berne virus (BEV), único aislado de EToV que se conoce hasta el momento, fue el primer torovirus que se describió (Weiss y col., 1983) y gracias a su adaptación al cultivo *in vitro* es el torovirus mejor caracterizado, pese a lo cual el conocimiento sobre él sigue siendo escaso. Aunque no se dispone de una secuencia genómica completa de BEV, en 2006 se resolvió la región faltante necesaria para ensamblar todo el genoma (Smits y col., 2006; Snijder y col., 1993). El torovirus bovino Breda (BRV) (Woode y col., 1982), descrito posteriormente, fue el primero en ser secuenciado completamente (Draker y col., 2006). Aunque se han descrito varias especies de BToV sus análisis se basan principalmente en estudios epidemiológicos (Gulacti y col., 2014; Haschek y col., 2006; Hoet y col., 2004; Ito y col., 2010; Kirisawa y col., 2007; Park y col., 2008). En el caso del torovirus porcino, inicialmente se detectó su presencia en heces de cerdos mediante microscopía electrónica (Kroneman y col., 1998; Scott y col., 1987), sin embargo, gracias a las técnicas de amplificación genómica se han identificado numerosos ejemplos en distintos países (Pignatelli y col., 2009; Pignatelli y col., 2010b; Shin y col., 2010; Zhou y col., 2013), habiendo sido publicadas recientemente las primeras secuencias completas de un torovirus porcino (Anbalagan y col., 2014; Sun y col., 2014). Respecto al torovirus humano, varios estudios han reportado la presencia de partículas virales en heces de niños (Beards y col., 1984; Jamieson y col., 1998), sin embargo a nivel genómico solo se ha podido amplificar una pequeña región del extremo 3' de su genoma.

Hasta hace relativamente poco tiempo, el torovirus equino BEV era el único aislado que había podido ser propagado en cultivo *in vitro*, sin embargo en 2007 kuwavara y colaboradores



Esquema 1: Modelo morfológico de la partícula viral de torovirus.

En la figura se muestra de forma esquemática la forma arriñonada **A)** y la forma de barra **B)**. En el interior se encuentra la nucleocápsida compuesta por la proteína N y el RNA genómico. Alrededor está la membrana lipídica en la que se embebe la proteína M, y donde están ancladas las proteínas S y HE que forman las espículas.

describieron que la cepa Aichi/2004 de BToV es capaz de crecer en la línea celular humana HRT-18 que deriva de un adenocarcinoma rectal (Kuwabara y col., 2007). Además, estas mismas células han sido utilizadas posteriormente para aislar varias cepas más de BToV (Aita y col., 2012; Ito y col., 2010).

1.2 Morfología y estructura de la partícula viral

El elemento más distintivo de la partícula viral es la nucleocápsida, que tiene forma de barra flexible de aproximadamente 100 nm de longitud y 23 nm de diámetro, compuesta por el genoma viral y multitud de copias de la proteína de la nucleocápsida (N) rodeando a este (Ver esquema 1).

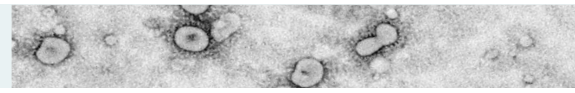
A su vez la nucleocápsida está envuelta por una membrana lipídica en la que se encuentra insertada la proteína de la membrana (M), con su extremo amino terminal (N-terminal) expuesto hacia el exterior de la partícula, y el extremo carboxilo terminal (C-terminal) hacia el interior, en contacto con la nucleocápsida. Las proteínas de la espícula (S) y la hemaglutinina-esterasa (HE) constituyen las dos coronas de espículas de 20 nm y 8-9 nm de longitud, respectivamente, presentes en el exterior de la partícula viral (Cornelissen y col., 1997; Weiss y col., 1983; Woode y col., 1982). En BEV, la proteína HE está ausente debido a una delección parcial del gen que la codifica

(Snijder y col., 1991a), producida probablemente durante su adaptación al crecimiento en cultivos celulares. Un caso similar ocurre con las cepas de BToV adaptadas a cultivo celular, Niigata3 (Aita y col., 2012) y Aichi/2004 (Kuwabara y col., 2007), las cuales poseen un gen HE truncado tras su adaptación a cultivo celular, sin embargo los aislados originales poseen un gen HE intacto.

La nucleocápsida de los torovirus posee cierta flexibilidad lo que permite adoptar a las partículas virales distintas formas, una forma alargada (forma mayoritaria en las partículas observadas en el interior de la célula) o una forma más arriñonada o de disco bicóncavo de unos 120-140 nm de diámetro (mayoritariamente observada en el exterior de la célula). Esta última característica, las partículas con forma toroide, fue la que dio nombre a este género de virus (Weiss y col., 1983).

1.3 Organización genómica y replicación

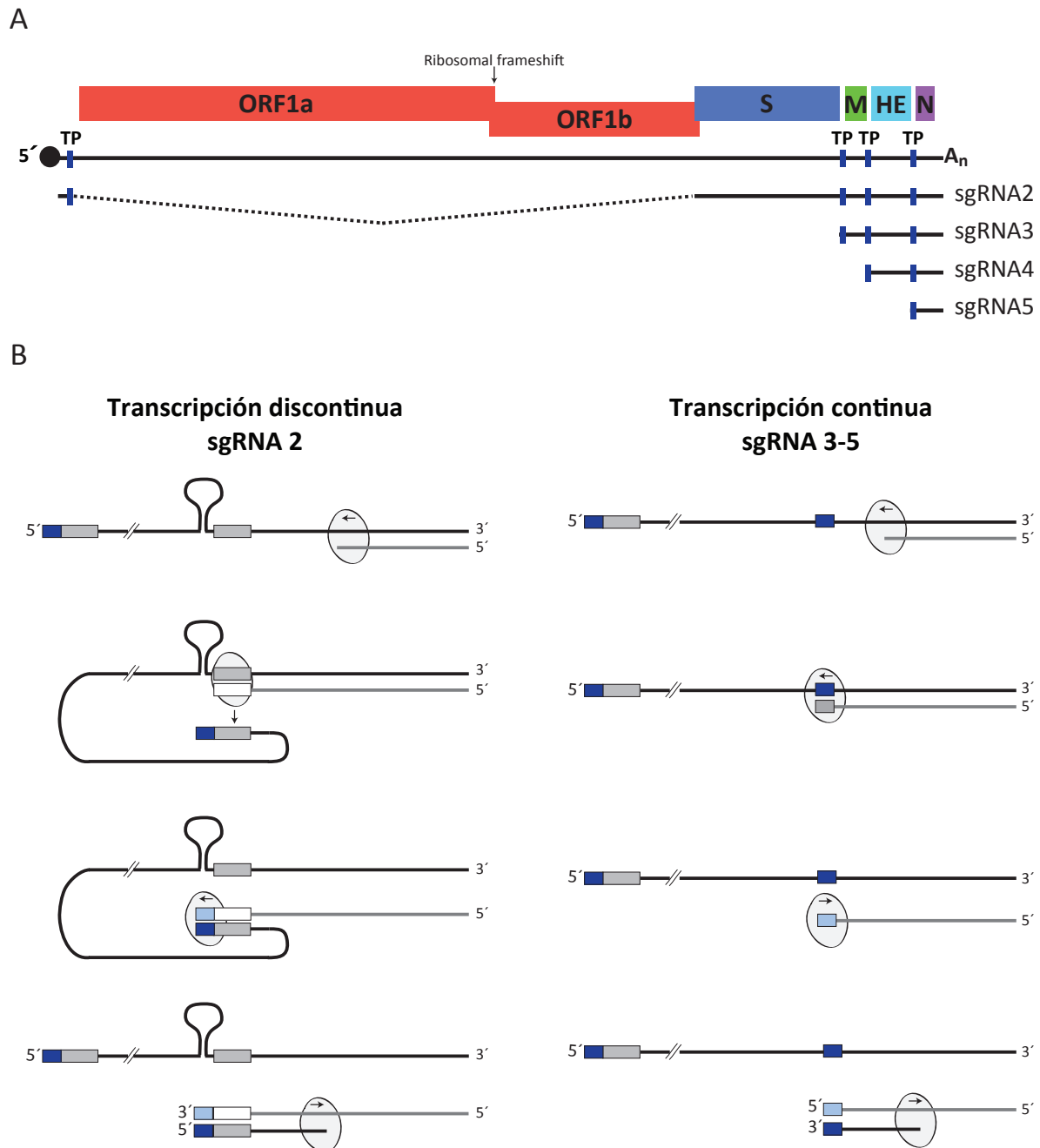
El genoma de los torovirus consiste en una única molécula de ssRNA⁺ de aproximadamente 28 kb, que posee una estructura cap en su extremo 5' y una cola de poliadeninas (poli-A) en su extremo 3' (Anbalagan y col., 2014; Draker y col., 2006; Smits y col., 2006; Sun y col., 2014; van Vliet y col., 2002). La estructura del RNA genómico consta de dos regiones no traducidas (NTR) en los extremos 5' y 3' de unos 800 y 200 nucleótidos, respectivamente,



variando ligeramente entre especies. Estas regiones contienen las secuencias necesarias para la síntesis de las cadenas positivas y negativas del RNA genómico y de los mRNA subgenómicos (sg), así como las secuencias de empaquetamiento del

RNA viral (Smits y col., 2005; Snijder y col., 1991b).

El RNA genómico de los torovirus consta de seis marcos de lectura abierta (ORF) (Ver esquema 2). Los dos primeros tercios están ocupados por dos grandes ORFs, ORF1a y ORF1b, el segundo de los



Esquema 2: Organización y expresión del genoma de los torovirus.

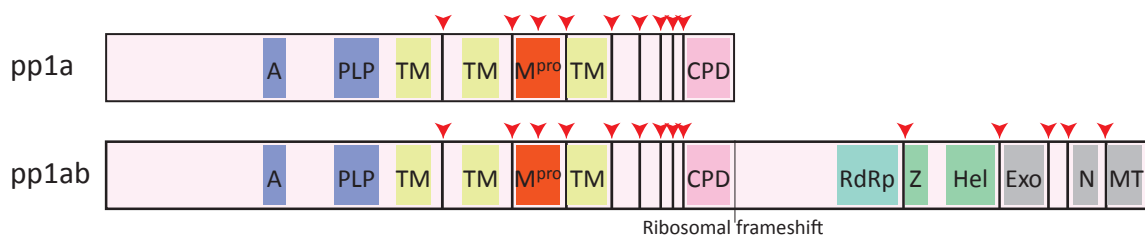
A) El RNA viral, que tiene una estructura cap en su extremo 5' (punto negro) y una cola de poliadeninas (An) en su extremo 3', da lugar a un mRNA completo y cuatro mRNAs subgenómicos 3'coterminales. **B)** Modelo de síntesis discontinua (sgRNA 2) y continua (sgRNAs 3-4) de los sgRNAs de torovirus. Los detalles de la síntesis están descritos en el texto. La cadena positiva (negro) con las secuencia reguladoras TP (rectángulo azul oscuro) y DTE (rectángulo gris), sirve de molde para la trascrición de la cadena negativa (gris). Las secuencias complementarias TP y DTE de la cadena negativa están representadas con colores más claros. (Modificado de Van Vliet y col., 2002).

cuales solo se expresa bajo un cambio en la fase de lectura del ribosoma (*ribosomal frameshifting*) justo antes del codón de stop del ORF1a, lo cual ocurre con una eficacia de un 20 a un 30 % (Draker y col., 2006; Snijder y col., 1990a). El uso de un *ribosomal frameshifting* es un mecanismo conservado en todos los nidovirus, lo que sugiere que la expresión diferencial del ORF1a y el ORF1b es biológicamente relevante o esencial para la replicación de estos virus. La expresión de estos ORFs produce dos grandes poliproteínas parcialmente solapadas, pp1a y pp1ab, que contienen las proteínas que constituyen la replicasa viral. El tercio restante del genoma contiene los ORFs 2, 3, 4 y 5, que codifican las proteínas estructurales del virus S, M, HE y N, las cuales se expresan a partir de cuatro mRNAs subgenómicas (sgRNAs), todos ellos coterminales con extremo 3' del RNA genómico (Snijder y col., 1990c), hecho que caracteriza y da nombre al orden *Nidovirales*. Estos sgRNAs, a pesar de ser estructuralmente policistrónicos, actúan como unidades monocistrónicas de transcripción, de manera que solo el gen en la posición 5' es traducido y da lugar a una proteína.

La replicación del genoma y la síntesis de los sgRNAs (Ver esquema 2) se produce a través de intermediarios de RNA de polaridad negativa. Durante la replicación de los torovirus, el complejo de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) reconoce señales en el extremo 3' del RNA genómico e inicia la síntesis de una cadena completa de RNA de polaridad negativa (ssRNA- o antígeno), que a su vez sirve de molde para la síntesis del nuevo RNA genómico. Este RNA genómico recién sintetizado, además de ser utilizado para su propia amplificación y para la expresión de las proteínas de la replicasa, sirve de molde para la producción de los sgRNAs de polaridad negativa que actuarán como intermediarios de transcripción.

Los torovirus utilizan un mecanismo de transcripción único entre los nidovirus, combinando un mecanismo de síntesis de RNA continuo para producir los sgRNAs 3, 4 y 5, con uno discontinuo para el sgRNA 2. De manera similar a

los sgRNAs de corona- y arterivirus, el sgRNA 2 correspondiente a la proteína S es una quimera con una secuencia líder de 15 a 18 nucleótidos idéntica al extremo 5' del genoma. Sin embargo los sgRNAs 3, 4 y 5, correspondientes a las proteínas M, HE, y N carecen de secuencia líder y son co-lineales con el genoma viral. Los genes de estas proteínas están precedidos de pequeñas regiones intergénicas no codificantes (5'-AC-N2-3-UCUUUAGA) (Snijder y col., 1990c), que actúan como señales de parada prematura durante la síntesis de la cadena negativa, y como promotores de la síntesis de la cadena positiva de los sgRNAs, siendo conocidas como regiones terminadoras/promotoras (TP). A diferencia de los anteriores, el ORF2 solapa con el gen de la replicasa (ORF1b) y carece de elemento TP que le preceda, (de Groot, 2008; Smits y col., 2005; van Vliet y col., 2002). En torovirus se ha observado que la síntesis discontinua está dirigida por una secuencia conservada en BToV, BEV y PToV, provisionalmente designada como elemento de transcripción discontinua (DTE). Este elemento se localiza dentro del ORF1b y consiste en una estructura secundaria del RNA junto a una región adyacente con complementariedad de secuencia con el extremo 5' del genoma localizada inmediatamente anterior a la secuencia TP de esta región. Esta estructura secundaria, en forma de lazo, actuaría atenuando la síntesis de la cadena negativa para permitir el cambio de molde al extremo 5' del RNA genómico el cual estaría facilitado por la complementariedad de secuencia entre el extremo 3' de la cadena negativa naciente y la región complementaria DTE del extremo 5' del RNA genómico. Después del cambio de molde, la síntesis del RNA continúa a través del elemento TP allí presente. Por lo tanto, la cadena negativa resultante del sgRNA 2, es una quimera que porta un anti-TP en su extremo 3', el cual probablemente actúa como promotor de la síntesis de la cadena positiva a través de un mecanismo de síntesis continua.



Esquema 3. Proteínas no estructurales.

Los torovirus producen dos grandes poliproteínas parcialmente solapantes que son procesadas post-traduccionamente por las proteasas virales M^{pro} y PLP para liberar las proteínas no estructurales (nsps) maduras. En el esquema se representan los dominios conservados localizados en torovirus, así como el modelo propuesto de procesamiento de la pp1a/pp1ab por la proteasa M^{pro} (puntas de flecha rojas). A, adenosina difosfato ribosa 1''-fosfatasa o ADPR; PLP, proteasa tipo papaína; M^{pro}, proteasa tipo quimiotripsina o proteasa principal; TM, dominios transmembrana; CPD, fosfodiesterasa cíclica; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; ZBD, dominio de unión a zinc; Hel, helicasa; ExoN, 3'-5' exoribonucleasa; XendoU, endoribonucleasa específica de poli-U; 2'-O-MT ribosa 2'-O-metiltransferasa.

1.4 Proteínas

1.4.1 Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales (nsps) de los torovirus, como las del resto de miembros del orden *Nidovirales*, se liberan tras el procesamiento post-traduccionales de las poliproteínas de la replicasa pp1a y pp1ab (Ver esquema 3). En BEV, la pp1a tiene un tamaño de 4569 aminoácidos, mientras que la versión extendida, pp1ab, tiene un tamaño de 6857 aminoácidos. Por su parte, las replicasas de BToV y PToV tienen un tamaño ligeramente inferior a las de BEV (Anbalagan y col., 2014; Draker y col., 2006; Sun y col., 2014).

Análisis computacionales de homología de secuencia con otros miembros del orden *Nidovirales* han revelado la presencia de dominios conservados en la replicasa de los torovirus, siendo la propia presencia y el orden de los mismos una característica conservada entre los nidovirus. En la pp1a se han localizado un dominio adenosina difosfato ribosa 1''-fosfatasa (ADRP), una proteasa tipo papaína (PLP), una proteasa tipo quimiotripsina o proteasa principal (M^{pro}), tres dominios transmembrana y un dominio fosfodiesterasa cíclica (CPD). Sin embargo los dominios más característicos y con mayor identidad de secuencia se encuentran en el ORF1b, donde se localiza el dominio RdRp, de unión a zinc (ZBD), helicasa (Hel), 3'-5' exoribonucleasa (ExoN), endoribonucleasa específica de poli-U (XendoU) y

ribosa 2'-O-metiltransferasa (2'-O-MT) (Draker y col., 2006; Smits y col., 2006; Snijder y col., 1990a).

El extremo N-terminal de la pp1a/pp1ab de torovirus es altamente divergente, y a excepción de los dominios PLP y ADPR, no existe una clara homología de secuencia con el resto de los nidovirus. De igual forma, comparaciones de secuencia entre BRV, BEV y PToV (Draker y col., 2006; Sun y col., 2014) muestran que esta región es la menos conservada entre los torovirus. Probablemente, como ocurre con el resto de nidovirus, esta región es procesada co-traduccionalmente o post-traduccionamente por la PLP dando lugar a dos o tres proteínas maduras.

Sin embargo, los cortes de la región central y el C-terminal de la pp1a/pp1ab recaen sobre la M^{pro}. Como ocurre en todos los nidovirus estudiados hasta ahora, el dominio M^{pro} de los torovirus está flanqueado por dos dominios hidrofóbicos típicos de proteínas transmembrana (TM2 y TM3) que permiten anclar la poliproteína a membranas citoplasmáticas. Además, en todos ellos existe un tercer dominio transmembrana (TM1) localizado entre el dominio PLP y el TM2, el cual permite anclar el dominio N-terminal de la poliproteína a membrana. En aquellos nidovirus donde se ha estudiado el procesamiento llevado a cabo por la PLP se ha observado que esta produce un corte en *cis* posterior al dominio TM1.

En torovirus la única proteína de la replicasa que se ha caracterizado es la M^{pro} de BEV (Smits y col., 2006). Sorprendentemente, en

contraste con las M^{pro} de coronavirus y ronivirus, pero similar a arterivirus, la M^{pro} de los torovirus usa una serina como residuo nucleofílico principal en vez de una cisteína. La M^{pro} de BEV tiene actividad autocatalítica, comprobándose experimentalmente que es capaz de liberarse por sí misma de la poliproteína tras cortar entre el dominio M^{pro} y la región TM flanqueante (³²⁴⁴FSFQ↓S³²⁵² y ³⁵⁴⁰FATQ↓S³⁵⁴⁴). La proteína M^{pro} madura tiene un tamaño de 33 kDa. En base a los ensayos experimentales con la M^{pro} de BEV, se conformó una secuencia consenso de corte (FXXQ↓(S,A)) de esta proteína, que ha permitido elaborar un esquema tentativo del procesamiento de la replicasa de BEV con sitios de corte conservados entre BEV y BRV (Smits y col., 2006) (Esquema 3).

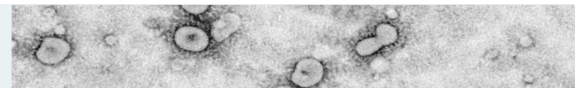
En el extremo C-terminal de la pp1a de los torovirus se encuentra un dominio CPD que está ausente en la replicasa de otros nidovirus, aunque algunos miembros de los *Betacoronavirus*, como MHV, lo expresan como proteína accesoria (ns2) (Snijder y col., 1991a). Su actividad enzimática no ha sido demostrada hasta ahora, aunque se ha comprobado que la delección de la secuencia codificante de la ns2 no causa efecto sobre la replicación de MHV *in vitro* (Schwarz y col., 1990). Sin embargo, cambios en los residuos del centro catalítico CPD atenúan el crecimiento del virus en ratones, indicado que tiene un importante rol en patogénesis (Roth-Cross y col., 2009).

El extremo C-terminal de la pp1ab, correspondiente a la secuencia codificante del ORF1b, contiene los dominios más conservados del genoma de los nidovirus. Aunque en torovirus únicamente se conoce la existencia de estos dominios por homología de secuencia, en coronavirus y arterivirus han sido ampliamente estudiados debido a que son enzimas clave para la replicación viral. Las RdRps de nidovirus han sido clasificadas como un subgrupo de la superfamilia 1 de las RdRps (Koonin, 1991). El dominio catalítico ocupa la región C-terminal de la proteína, y además contienen un gran dominio N-terminal cuya función no es muy conocida. Un modelo del

dominio catalítico mostró la típica topología de mano derecha abierta con los subdominios dedos, palma y pulgar de todas las polimerasa conocidas (Xu y col., 2003). La actividad enzimática fue demostrada utilizando formas recombinantes de la RdRp contenida en la nsp12 de SARS-CoV (Cheng y col., 2005; te Velthuis y col., 2010) y la nsp9 de EAV (Beerens y col., 2007).

A su vez, la RdRp está flanqueada en su extremo C-terminal por una proteína multidominio, la cual contiene un complejo ZBD en su extremo N-terminal y un dominio catalítico Hel en su extremo C-terminal. Estudios bioquímicos realizados en arterivirus y coronavirus demuestran que las helicasas de los nidovirus tienen múltiples actividades enzimáticas, tales como actividad NTPasa/dNTPasa, fuertemente estimulada por ácidos nucleicos, actividad RNA 5' trifosfatasa, relacionada con la incorporación del cap a los RNA recién sintetizados, y además son capaces de separar dúplex de RNA y DNA en dirección 5' a 3' de manera muy eficiente (Ivanov y col., 2004a; Ivanov y col., 2004b; Seybert y col., 2000a; Seybert y col., 2000b). Por su parte, se ha demostrado que el dominio ZBD es crítico para la actividad enzimática de la helicasa (Seybert y col., 2005).

Además, la maquinaria de replicación de los nidovirus incluye varias subunidades relacionadas con el procesamiento del RNA. La XendoU es una endonucleasa específica de uracilo que está conservada en todos los nidovirus y es capaz de cortar tanto RNA de cadena sencilla como de cadena doble. Aparte de la XendoU, los nidovirus con grandes genomas, pertenecientes a las familias *Coronaviridae* y *Roniviridae*, codifican una 3' a 5' exonucleasa asociada al mecanismo de corrección o *proofreading*, que se piensa que actúa mejorando la baja fidelidad de la RdRp, contribuyendo al mantenimiento de estos grandes genomas (Ulferts y col., 2011), así como la 2' O-metiltransferasa que parece implicada en los pasos de formación de la estructura cap del extremo 5' de los RNAs recién sintetizados (Decroly y col., 2008).



1.4.2 Proteínas estructurales

La proteína S es una glicoproteína de membrana de clase I, que se encuentra anclada en la envuelta viral constituyendo la corona de espículas grandes observadas en las partículas virales. Se sintetiza a partir del sgRNA 2 como un precursor de aproximadamente 200 kDa, el cual es procesado post-traduccionamente, para producir dos subunidades de 100 y 75 kDa (Horzinek y col., 1986; Snijder y col., 1990b). Aunque la función de la S en BEV no ha sido estudiada en detalle, por similitud con los coronavirus, se considera que esta proteína media la unión al receptor celular, el cual aún no ha sido identificado.

La proteína M, expresada a partir del sgRNA 3, es una proteína integral de clase III no glicosilada, con una masa molecular de 27 kDa, aunque debido a su elevada hidrofobicidad en los geles SDS-PAGE se visualiza como una proteína de 22 kDa. La topología de la proteína, como se predijo mediante análisis computacional y se confirmó por análisis bioquímico, es muy similar a la M de coronavirus. El extremo N-terminal de la proteína estaría localizado en el lumen del retículo endoplásmico (RE), la parte central estaría embebida en la membrana y el extremo C-terminal estaría localizado en la cara citoplasmática del RE (den Boon y col., 1991). En nuestro laboratorio se corroboró este modelo topológico mediante ensayos de inmunomarcaje e inmunofluorescencia utilizando anticuerpos producidos contra péptidos sintéticos correspondientes a los extremos N- y C-terminal de la proteína. Además se demostró que en las células infectadas con BEV la proteína M se acumula preferentemente en el compartimento intermedio, lo que sugiere que este es el sitio de ensamblaje viral (Garzon y col., 2006).

La proteína HE, producida a partir del sgRNA 4, es una glicoproteína de membrana de clase I, con una masa molecular de 65 kDa que se encuentra anclada a la envuelta viral constituyendo la corona de espículas pequeñas observadas en las partículas virales. La HE posee dos actividades aparentemente contradictorias,

por un lado tiene un dominio de unión a ácidos siálicos, y sirve como proteína de unión a receptor, y al mismo tiempo, tiene actividad acetilesterasa, actuando como enzima destructora de receptores. Además, la función biológica de la HE en el ciclo infectivo de los torovirus no está clara, ya que no es una proteína requerida para la propagación en cultivo celular, como demuestra el hecho de que BEV, así como ciertos aislados de BToV, hayan perdido parte del gen que la codifica durante su adaptación al cultivo celular. No obstante, parece jugar un papel importante en la interacción con el hospedador *in vivo* (Cornelissen y col., 1997; de Groot, 2006; Pignatelli y col., 2013).

La proteína N, producida a partir del sgRNA 5, es una fosfoproteína con múltiples sitios de fosforilación predichos. Tiene una masa molecular de 18,3 kDa, y es el componente proteico más abundante de la partícula viral, representando el 84 % de la masa proteica total. Experimentalmente se demostró su unión a ssRNA, y dado que su secuencia aminoacídica posee dos regiones básicas próximas en el espacio, se sugirió que estas regiones constituyen el dominio de unión al RNA (de Groot, 2008; Horzinek y col., 1985). Según el modelo actual, la proteína N sería la responsable de estabilizar el RNA genómico y, junto a él, constituiría la nucleocápsida de la partícula viral. Además, numerosos estudios han demostrado que la proteína N es requerida para la óptima replicación de los coronavirus, teniendo un papel, aun no muy claro, en los estadios tempranos de la síntesis de RNA (Almazan y col., 2004; McBride y col., 2014; Verheije y col., 2010).

1.5 Ciclo vital de los torovirus

Se sabe poco acerca del ciclo de vida de los torovirus, quedando limitado su conocimiento a unos cuantos estudios preliminares. Aunque se asume que la adsorción de los torovirus a la célula hospedadora está mediada por las proteínas estructurales S y HE, se desconoce si la entrada y liberación de la nucleocápsida en el citoplasma de la célula infectada ocurre vía fusión con la membrana

plasmática o a través de la ruta endocítica. De igual forma, por analogía con corona- y arterivirus, se piensa que la síntesis de RNA ocurre en asociación con vesículas de doble membrana, aunque estas estructuras no han sido observadas o notificadas en los distintos estudios ultraestructurales de células infectadas con BEV (Garzon y col., 2006; Horzinek y col., 1984; Weiss y col., 1986).

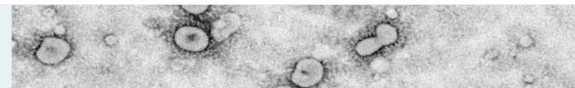
El proceso de morfogénesis de los torovirus se estudió inicialmente examinando células dérmicas equinas infectadas con BEV mediante ensayos de microscopía electrónica (Horzinek y col., 1984; Weiss y col., 1986), los cuales fueron corroborados por nuestro laboratorio y complementados utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas estructurales S, M y N de BEV en experimentos de microscopía electrónica y confocal (Garzon y col., 2006). En estos ensayos se observó que las proteínas estructurales se detectan a partir de las 6 h de infección en la región perinuclear, aunque su señal se dispersa por el citoplasma de la célula a tiempos más tardíos de infección. En el caso de la M y la S se observó que la señal se mantenía en la región perinuclear hasta aproximadamente las 12 hpi colocalizando con la proteína ERGIC-53, una proteína marcadora del compartimento intermedio entre el RE y el Golgi (ERGIC). La acumulación de las proteínas estructurales en el ERGIC sugiere que el ensamblaje de estos virus se produce en este compartimento (Garzón y col., 2006), aunque anteriormente se había propuesto que ocurría en las cisternas del Golgi (Weiss y col., 1986). Por microscopía electrónica las primeras partículas se detectan a las 10 hpi, tanto en cisternas del Golgi como en el RE. En el interior de la célula las partículas virales se observan, en general, como estructuras alargadas con forma de barra, aunque también existe un pequeño porcentaje de partículas virales con forma esférica o toroide. Sin embargo, a tiempos tardíos de infección, las partículas virales se localizan en vesículas citoplásmicas de secreción que se funden con la membrana plasmática liberando

su contenido al medio extracelular. Un estudio de la cinética de crecimiento de BEV mostró que el virus liberado se detecta inicialmente entre las 8 y las 9 hpi e incrementa su liberación de manera exponencial hasta las 15 hpi, momento en el que se alcanza la fase estacionaria. Este mismo estudio describió que los primeros efectos citopáticos aparecen a partir de las 21 hpi (Weiss y col., 1986). Observaciones, realizadas por nuestro grupo revelaron que a las 24 hpi las células E.Derm muestran características morfológicas típicas de células apoptóticas (Maestre y col., 2011).

1.6 Epidemiología y patogenia de los torovirus

Los torovirus han sido identificados como potenciales patógenos que inducen gastroenteritis y diarrea en humanos, así como en animales domésticos de interés en la industria ganadera (cerdos, vacas y caballos). Aparte de los hospedadores ya mencionados, en los que se ha demostrado la presencia de torovirus por distintas vías, también han sido detectadas partículas similares a torovirus en heces de perros, gatos y pavos. Además se ha demostrado la presencia de anticuerpos que reconocen BEV y BRV en otras especies de animales (ovejas, cabras, conejos, gatos y perros), lo que indica que pueden infectar un amplio rango de hospedadores (Hoet y col., 2008). Por otra parte, la distribución geográfica de los torovirus parece ser universal, ya que se ha reportado la presencia de torovirus en todos los continentes, habiendo sido identificados en todos aquellos países en los que se ha estudiado su presencia (Hoet y col., 2008; Prades y col., 2014). Cabe indicar que los datos epidemiológicos obtenidos por nuestro laboratorio respecto a torovirus porcino, muestran que este virus es ubicuo en la cabaña porcina española (Alonso-Padilla y col., 2012; Pignatelli y col., 2009; Pignatelli y col., 2010a).

En humanos existen numerosas evidencias que relacionan al HToV con casos de diarrea en jóvenes o ancianos, y en general se asocia con personas inmunocomprometidas. En muchos



casos, el HTov se ha identificado como un agente nosocomial (Jamieson y col., 1998; Koopmans y col., 1997; Krishnan y col., 1997; Lodha y col., 2005). En estos individuos la enfermedad se asocia a diarrea aguda o crónica que puede derivar en enterocolitis necrotizante. A pesar de este cuadro clínico, apenas se tienen datos sobre la patogénesis de este grupo de virus, quedando reducido su estudio a ensayos experimentales basados en BToV, el cual produce una diarrea de moderada a severa al ser inoculado vía oral e intranasal en terneras gnotobióticas desprovistas de calostro (Fagerland y col., 1986; Hoet y col., 2004; Pohlenz y col., 1984; Woode y col., 1982). En los animales infectados, BToV infecta rápidamente los enterocitos de la parte baja de las vellosidades, extendiéndose entre las criptas intestinales del yeyuno, íleon, ciego y colon, lo cual desemboca en diarrea entre las 24 y 72 hpi. El mecanismo por el cual BToV induce diarrea se desconoce, aunque se especula que las lesiones producidas por el virus reducen la capacidad del tracto intestinal de absorber agua (Woode y col., 1982).

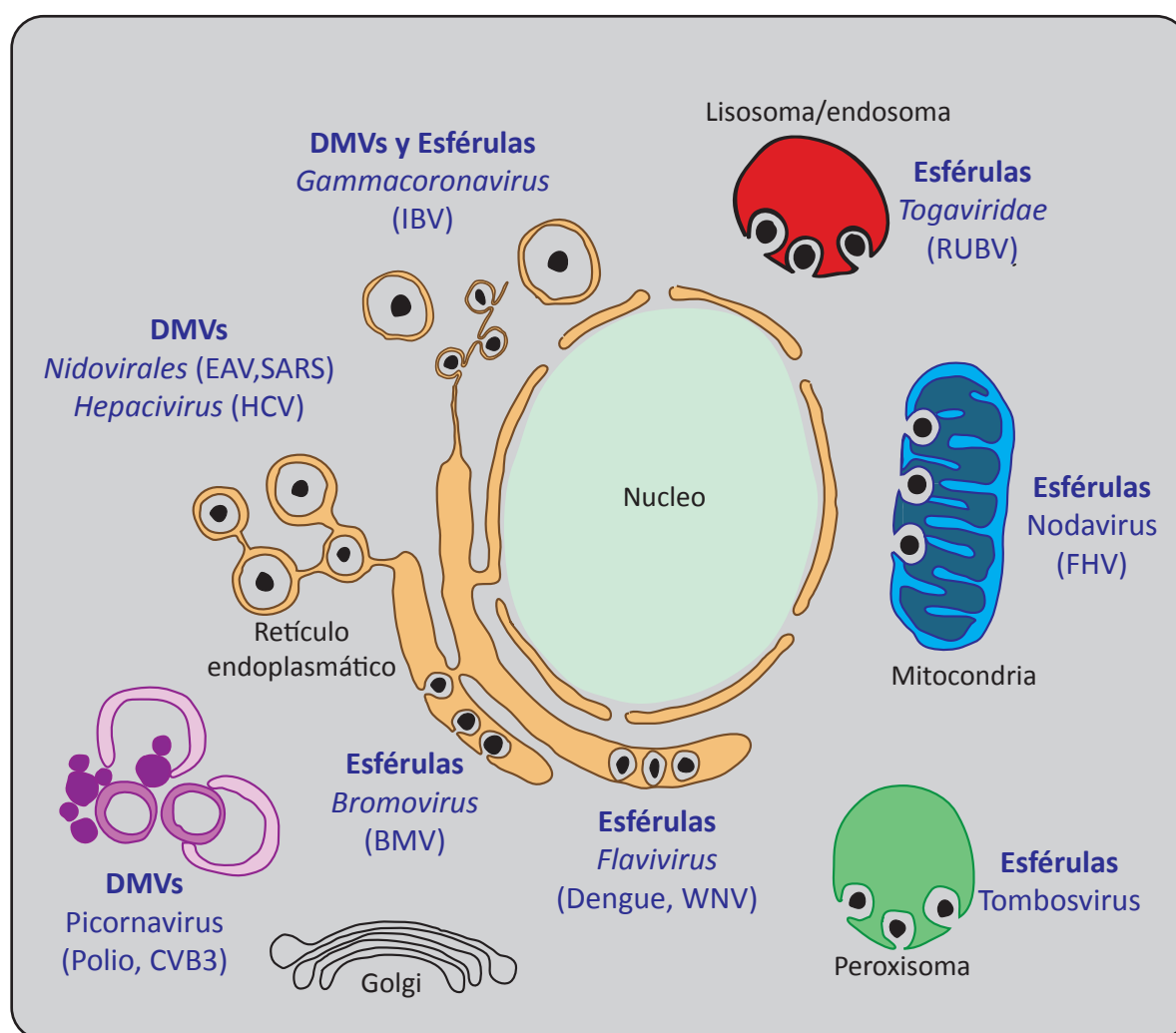
2. Factorías de replicación

Los virus son parásitos intracelulares obligados que modifican la célula huésped para generar un ambiente óptimo en la producción de su progenie viral. En el caso de los virus ssRNA+ se ha documentado extensamente que modifican membranas celulares citoplasmáticas para formar sus complejos de replicación y transcripción. Por un lado, estas estructuras sirven como plataforma para concentrar todos los componentes requeridos durante la replicación, y por otro, proporcionan una separación física que protege al RNA viral, especialmente el RNA de doble cadena (dsRNA) generado como intermediario de replicación, de los mecanismos de defensa antiviral de la célula huésped.

El uso de técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión ha permitido identificar numerosas factorías virales

inducidas por los virus ssRNA+. Sin embargo, no ha sido hasta esta última década cuando, gracias a la tomografía electrónica, se ha avanzado en su visualización y en el conocimiento de su biogénesis (den Boon y col., 2010; Harak y col., 2015; Miller y col., 2008; Netherton y col., 2011; Romero-Brey y col., 2014). A pesar de la gran diversidad existente entre las distintas familias de virus ssRNA+ y la disparidad en el origen membranoso utilizado para formar las factorías de replicación, estas estructuras presentan características comunes en cuanto a su morfología (Ver esquema 4).

En general, se han identificado dos tipos de estructuras principales, las invaginaciones tipo esférulas y las vesículas de doble membrana (DMVs). Un ejemplo de las primeras es el virus del mosaico del bromo (BMV), un bromovirus patógeno de plantas que induce invaginaciones tipo esférulas para anclar sus complejos de replicación. Estas esférulas se forman a partir de invaginaciones del RE y contienen un canal que conecta el interior de la esférula con el citoplasma (Schwartz y col., 2002). El norovirus *Flock house virus* (FHV) es otro ejemplo en el que se induce la formación de esférulas, pero en este caso, estas se forman a partir de las membranas externas de la mitocondria. Estas esférulas tienen un tamaño de 50 a 70 nm con un poro de 10 nm (Kopek y col., 2007). El virus de la rubeola (RUBV), perteneciente a la familia *Togaviridae*, induce la formación de una gran estructura vesicular denominada vacuola citopática de 600 a 2000 nm, derivada de endosomas y lisosomas, que contiene numerosas invaginaciones a modo de esférulas de 50 nm (Fontana y col., 2010). Otro ejemplo característico es el proporcionado por los miembros del género *Flavivirus*. Un sofisticado estudio de tomografía electrónica realizado en células infectadas con el virus del Dengue (DENV) muestra que este virus induce la formación de tubos alargados del RE con invaginaciones a modo de esférulas. Las invaginaciones inducidas por DENV tienen un diámetro de 80-90 nm y contienen poros de 10 nm que conectan el interior de las vesículas con



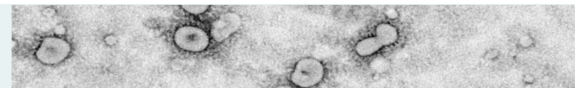
Esquema 4: Modelos de factorías de replicación viral en los virus ssRNA+.

Estos virus utilizan membranas de diferentes orgánulos celulares para formar sus factorías de replicación. Han sido identificadas dos estructuras principales: invaginaciones tipo esférulas o vesículas de doble membrana (DMVs). Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/1951.html

el citoplasma. Las esférulas inducidas por el virus se identificaron como los sitios de replicación al ser inmunomarcadas con anticuerpos específicos frente a las nsps implicadas en replicación, así como con anticuerpos anti-dsRNA (Welsch y col., 2009). Además este estudio mostró que el DENV induce una gran red membranosa que comunica los sitios de replicación viral con los sitios de síntesis proteica y los de ensamblaje. Estructuras similares también se han visualizado en células infectadas con el flavivirus *West Nile* (WNV) (Gillespie y col., 2010).

Un ejemplo de virus que induce estructuras tipo DMVs, es el virus de la hepatitis C (HCV) que

provoca una gran remodelación de membranas intracelulares conocida como red membranosa (MW). La presencia de nsps y dsRNA en la MW inducida por HCV sugirió que esta estructura era el sitio de replicación viral. Además algunos estudios asocian la formación de la MW con gotas lipídicas celulares (Miyanari y col., 2007). Un estudio más detallado de la MW inducida por HCV revela que la mayoría de los componentes son DMVs, las cuales probablemente derivan de membranas del RE. Los análisis de tomografía muestran que entorno al 10 % de las DMVs presentan una apertura en forma de poro que conecta el citoplasma con el interior de las DMVs (Romero-Brey y col., 2012).



Junto a los nidovirus, que trataremos a continuación, otro ejemplo característico lo proporcionan los picornavirus. Estos virus promueven una remodelación masiva de membranas sin estar muy claro el origen de las mismas. En las infecciones con poliovirus se ha observado tanto la presencia de vesículas de membrana simple (SMVs) como DMVs, y se sabe que su aparición es dependiente del tiempo de infección. A tiempos tempranos se observan pequeños grupos de SMVs, probablemente derivadas de las membranas del Golgi, que previsiblemente dan lugar a las DMVs, ya que se ha observado que las DMVs se van acumulando a medida que avanza la infección, mientras que las SMVs desaparecen. Aunque se ha detectado señal de dsRNA y proteínas virales tanto en SMVs como en DMVs, la replicación viral correlaciona mejor con la aparición de las SMVs (Belov y col., 2012). El picornavirus CVB3 induce también una transición similar entre estructuras SMVs y DMVs (Limpens y col., 2011).

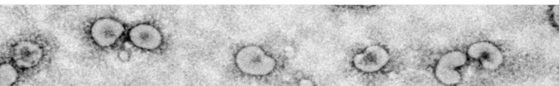
2.1 Factorías de replicación inducidas por los nidovirus

Los nidovirus se caracterizan por inducir la formación de vesículas tipo DMVs en las células que infectan. Estudios ultraestructurales llevados a cabo mediante técnicas de microscopía electrónica convencional han mostrado la presencia de DMVs en las células infectadas con el arterivirus EAV (Pedersen y col., 1999), los betacoronavirus SARS-CoV (Goldsmith y col., 2004; Snijder y col., 2006), MHV (Gosert y col., 2002; Ulasli y col., 2010) y MERS-CoV (de Wilde y col., 2013), el alphacoronavirus NL63-CoV (Orenstein y col., 2008) y el gammacoronavirus IBV (Maier y col., 2013b). Los primeros estudios realizados en EAV indicaron que las DMVs podían ser el sitio donde ocurre la replicación viral al observar que el RNA de nueva síntesis, marcado con BrUTP, y las proteínas de la replicasa se localizan mayoritariamente en la zona de las DMVs. Además, se observó que estas DMVs tenían un diámetro aproximado de 80-100 nm, y

presentaban algunas conexiones con el RE a través de membranas pareadas (Pedersen y col., 1999). De manera similar, en MHV (Gosert y col., 2002) y SARS-CoV (Snijder y col., 2006), se comprobó la asociación de las DMVs con la replicación viral, al observar nuevamente que el RNA viral, marcado mediante hibridación *in situ*, y las proteínas de la replicasa se localizaban nuevamente en el área de las DMVs. Sin embargo una diferencia aparente con EAV, es que en estos coronavirus el diámetro de las DMVs es de 200-300 nm.

Posteriormente, un ensayo de tomografía electrónica mostró que las DMVs inducidas por SARS-CoV no son entidades aisladas sino que forman parte de una red reticulovesicular de membranas modificadas del RE (RVN) que está formada por membranas enmarañadas (*convoluted membranes*, CMs) y numerosas DMVs conectadas entre sí por la membrana externa (Knoops y col., 2008). Además se comprobó que las proteínas de la replicasa se localizan mayoritariamente en la región de las CMs, mientras que el intermediario de replicación, el dsRNA, se localiza exclusivamente en el interior de las DMVs, lo que sugiere que la replicación en estos virus puede ocurrir en el interior de las DMVs. Sin embargo un estudio en detalle del tomograma no muestra conexiones entre el interior de las DMVs y el citoplasma que permitan el transporte del RNA naciente de nueva síntesis hacia el citosol. De manera similar, un estudio relacionado, mostró que el arterivirus EAV también induce la formación de una RVN para llevar a cabo su replicación aunque en este caso no se observó la presencia de CM (Knoops y col., 2012). Nuevamente, las DMVs inducidas por EAV carecen de un canal o poro visible que conecte el interior de la vesícula con el citoplasma.

En el caso de MHV, un análisis ultraestructural cualitativo y cuantitativo a lo largo de la infección (Ulasli y col., 2010) mostró que las primeras estructuras en aparecer tras la infección eran las DMVs y a continuación aparecen las CMs, lo que indica que estas últimas estructuras no son un estadio previo de la formación de DMVs.



Además, a tiempos tardíos se observó la presencia de nuevas estructuras como cuerpos tubulares, grandes vacuolas que contienen viriones, y membranas cubicas, aunque su presencia se relacionó más bien con el proceso de ensamblaje del virus.

Recientemente, un estudio llevado a cabo con IBV ha mostrado que este virus, al igual que el resto de coronavirus, induce la formación de DMVs (200 nm aproximadamente) derivadas del RE. Sin embargo, lo más sorprendente fue la presencia de esférulas de aproximadamente 60-80 nm de diámetro formadas a partir de membranas en cremallera o zippered derivadas del RE, y que muestran un gran parecido con las membranas pareadas inducidas por EAV (Maier y col., 2013b). El análisis por tomografía electrónica muestra que las esférulas tienen un canal de aproximadamente 5 nm que conecta el interior de la vesícula con el citoplasma, especulándose que estas estructuras pueden ser los sitios donde ocurre la replicación de IBV.

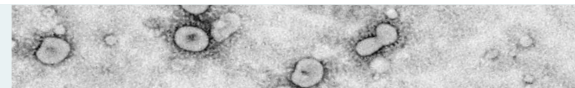
A pesar de que todos los estudios ultraestructurales sugieren que las DMVs derivan del RE, existe una gran controversia sobre el origen de las mismas, ya que no se ha observado una clara colocalización entre los marcadores tradicionales del RE y las proteínas de la replicasa. Únicamente se ha observado colocalización con la proteína sec61 que forma parte del canal translocador del RE por el que entra al lumen el polipéptido nascente del ribosoma (Knoops y col., 2010).

2.2 Papel de los complejos de replicación en la formación de las factorías virales de los nidovirus

Numerosos estudios realizados en arterivirus y coronavirus muestran que los complejos de replicación de estos virus están formados principalmente por las proteínas de la replicasa, aunque también se ha descrito la implicación de factores celulares. Ensayos de inmunofluorescencia muestran que las nsps se localizan principalmente en la región perinuclear de la célula, colocalizando

entre sí y con el RNA de nueva síntesis, para formar los complejos de replicación viral (RTC). A su vez, el inmunomarcaje de cortes ultrafinos muestra que las nsps se localizan en la región de las DMVs, mayoritariamente asociadas a la membrana de la RVN, mientras que el dsRNA se localiza exclusivamente en el interior de las DMVs. Aunque se asume que las DMVs son el lugar donde ocurre la replicación, existe cierta controversia ya que los ensayos de inmunofluorescencia no muestran una clara colocalización entre el dsRNA y las nsps (Hagemeijer y col., 2012; Harcourt y col., 2004; Knoops y col., 2008; Knoops y col., 2012; Prentice y col., 2004b; Snijder y col., 2006; Ulasli y col., 2010; van der Meer y col., 1998). Aun así, no cabe duda de que los RTCs se localizan en la RVN inducida por estos virus, y por lo tanto, es el sitio donde ocurre la replicación y la transcripción. En esta línea, el grupo del Dr. Eric Snijder consiguió reproducir *in vitro* la síntesis del RNA viral utilizando RVNs aisladas de células infectadas con EAV y SARS-CoV (van Hemert y col., 2008a; van Hemert y col., 2008b). Estos ensayos muestran que los RTCs están protegidos por membranas, demostrando que las nsps y el RNA de nueva síntesis están aislados de la degradación de proteasas y nucleasas, mientras que son susceptibles a su degradación tras la adición de detergentes no iónicos.

Por su parte, los dominios TM de la replicasa son los responsables de anclar los RTCs a las membranas intracelulares, y se asume que son los responsables de la reorganización membranosa que da lugar a la formación de la RVN. En arterivirus se demostró que la co-expresión de las nsps 2 y 3, correspondientes con los dominios TM de estos virus, son suficientes para inducir la formación de DMVs y membranas pareadas (Posthuma y col., 2008; Snijder y col., 2001). De manera similar, se requiere la co-expresión de las proteínas de anclaje a membrana nsp3, nsp4 y nsp6 de SARS-CoV para inducir la formación de DMVs (Angelini y col., 2013), mientras que la coexpresión de la nsp3 y nsp4 da lugar a la formación de estructuras membranosas formadas por membranas pareadas.



3. Autofagia

La autofagia es un mecanismo intracelular muy conservado que cumple un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis celular, y en la supervivencia de la célula bajo condiciones de estrés. La autofagia clásica o macroautofagia (aquí referida como autofagia) es un proceso catabólico en el que componentes del citoplasma u orgánulos dañados son secuestrados en vesículas de doble membrana, conocidas como autofagosomas, los cuales son degradados vía lisosomal. La ruta autofágica surge evolutivamente como un mecanismo adaptativo de la célula eucariota a condiciones de estrés por falta de nutrientes, conocido como condición de ayuno, que permite la movilización de nutrientes mediante el sacrificio de parte de su citosol. Aunque la autofagia fue descrita como un proceso no selectivo, hoy en día parece claro que es un proceso altamente específico y muy regulado, que requiere la participación de proteínas de carga reconocidas por la maquinaria autofágica.

3.1 Mecanismos moleculares de la autofagia

En levaduras se han identificado al menos 30 genes relacionados con autofagia (*Atg*), que cumplen una función muy importante en la regulación y ejecución de la misma, estando muchos de ellos conservados en mamíferos. Los productos de estos genes intervienen en las distintas etapas de la autofagia (Esquema 5). Tras la inducción de la ruta por diversos estímulos (Iniciación) se forma una estructura de doble membrana con forma de copa conocida como membrana aislada o fagoforo (Nucleación). A continuación la membrana aislada se expande (Elongación) engullendo parte del contenido citoplasmático, incluyendo orgánulos, para terminar fusionando sus extremos y formar los autofagosomas. Finalmente la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma permitiendo que sus enzimas degraden la membrana interna y el contenido del autofagosoma (Fusión y degradación) (Lamb y col.,

2013; Mizushima y col., 2011; Tanida, 2011).

3.1.1 Iniciación

Diferentes vías de señalización y proteínas están implicadas en la activación de la ruta, siendo el complejo de la quinasa diana de la rapamicina C1 de mamíferos (mTORC1) el que controla la iniciación de la autofagia. Bajo condiciones normales, mTORC1 está asociado al complejo Atg1/ULK quinasa (*UNC-51-like kinase*) manteniendo a este último inactivo (Wirth y col., 2013). Tras un estímulo, por ejemplo por déficit de aminoácidos o el tratamiento con la droga rapamicina, mTORC1 es inactivado y disociado del complejo ULK, permitiendo a este disparar la cascada de señales necesarias para producir la nucleación del autofagosoma. Las quinasas ULK1 y ULK2 que forman parte del complejo ULK tienen un dominio C-terminal de unión a membrana, lo cual probablemente media el reclutamiento de este complejo al sitio de iniciación del autofagosoma.

Diversos procesos homeostáticos de la célula disparan la activación de la ruta autofágica, vía mTORC1, ante una desviación como puede ser una disminución en los niveles de nutrientes (ayuno), una bajada de los niveles energéticos, falta de factores de crecimiento o insulina. Además, la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) por estrés de RE también conlleva la inhibición de mTORC1.

3.1.2 Nucleación

El proceso de nucleación requiere la formación de un gran complejo proteico en el que la proteína Vps34, una enzima fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de clase III, promueve la producción de fosfoinositol-3-fosfato (PI3P), el cual a su vez actúa como señal lipídica reclutando otras proteínas Atg que promueven la nucleación y expansión del fagoforo o membrana aislada. La actividad de Vps34 depende de su asociación con Beclin 1 (Liang y col., 1999), siendo esta última una proteína esencial en este paso de la ruta. Las quinasas del complejo ULK actúan directamente sobre Beclin 1 promoviendo la activación de

Vps34 en respuesta a una activación de la ruta autofágica vía mTORC1 (Russell y col., 2013). Las drogas Wortmanina (Wn) y 3-metiladenina (3-MA) actúan inhibiendo la actividad de PI3K y han sido extensamente utilizadas para inhibir la formación de autofagosomas (Blommaert y col., 1997).

El origen de la membrana de los autofagosomas, y por lo tanto su sitio de nucleación, no está bien definido. A pesar de no haber evidencias definitivas, en mamíferos se ha consensuado que los autofagosomas provienen del RE. Específicamente, bajo estímulos de ayuno los componentes del complejo UKL y PI3K se han observado en la superficie del RE formando puntos sobre la membrana (Itakura y col., 2010; Matsunaga y col., 2010). Además, se ha propuesto que regiones específicas del RE enriquecidas en PI3P, denominadas omegasomas por su forma Ω , puedan ser los sitios de formación de los autofagosomas (Axe y col., 2008; Lu y col., 2011). Esta idea se ha visto reforzada por dos estudios ultraestructurales por tomografía electrónica (Hayashi-Nishino y col., 2009; Yla-Anttila y col., 2009).

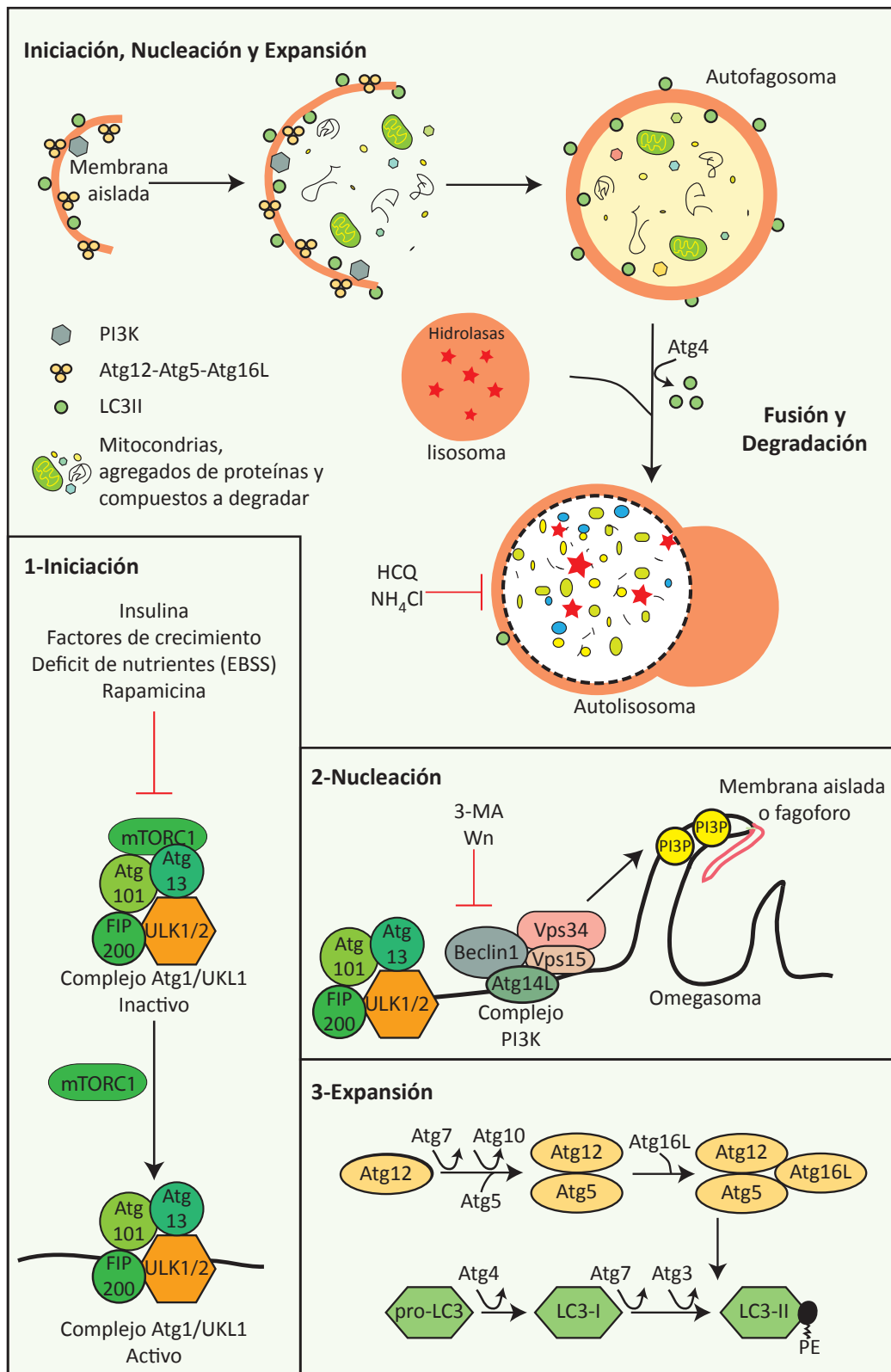
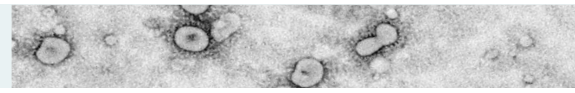
3.1.3 Expansión

Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina, Atg12 y Atg8/LC3, contribuyen directamente en la elongación y cierre de los autofagosomas. En el primer sistema, la Atg12 es activada por la Atg7 (enzima tipo E1), transferida a la Atg10 (enzima tipo E2) y conjugada covalentemente a la proteína Atg5 (Mizushima y col., 1998). Este complejo a su vez interactúa con Atg16L1 formando el complejo Atg16L1-Atg12-Atg5 el cual se asocia principalmente con la membrana externa del autofagosoma y se disocia justo antes del cierre del mismo. El segundo sistema Atg8/LC3, también conocido como sistema de lipidación, tiene como función incorporar el fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) al complejo. En levaduras, Atg8 es sintetizada como pro-Atg8, la cual es procesada por la proteasa Atg4, activado por la enzima Atg7, y transferida a la Atg3 (enzima

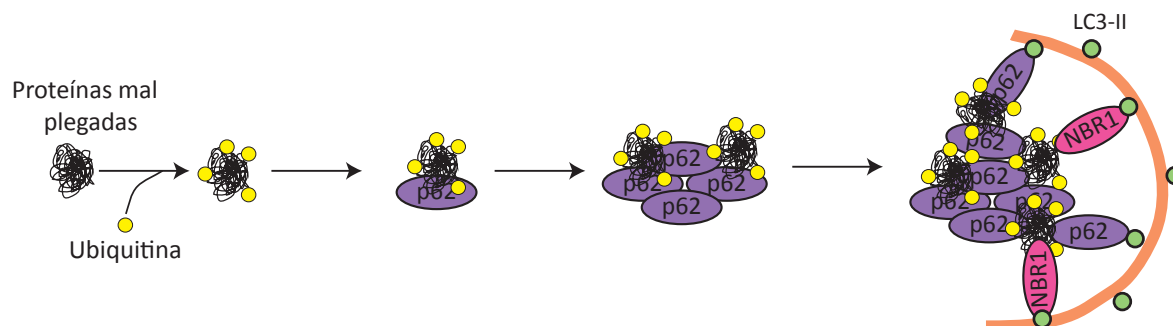
tipo E2) para finalmente ser conjugada con el fosfolípido PE. En los mamíferos se han identificado seis homólogos de Atg8, de los cuales la proteína LC3B es la mejor caracterizada y es la considerada como el verdadero homólogo funcional de Atg8 (Kabeya y col., 2000). Al igual que su homólogo en levaduras, LC3 es sintetizada como pro-LC3, la cual es procesada por la proteasa Atg4B para formar LC3 I. Esta a su vez, es activada por Atg7, transferida a Atg3 y finalmente conjugada con el fosfolípido PE dando lugar a la proteína LC3II. La proteína LC3 normalmente se encuentra soluble y dispersa por el citoplasma, pero tras un estímulo de activación de la ruta es procesada y lipidada, quedando asociada a la membrana externa e interna del autofagosoma. Debido a que es una proteína que se asocia establemente a los autofagosomas, ha sido ampliamente utilizada como marcador de autofagosomas en numerosos estudios de autofagia (Klionsky y col., 2012).

Aunque no está bien definida la relación existente entre ambos sistemas de conjugación, se sabe que el sistema Atg12 está estrechamente interrelacionado con el sistema Atg8/LC3. Células deficientes en Atg5 tienen un defecto en la lipidación Atg8/LC3 (Mizushima y col., 2001; Mizushima y col., 2003). Además se piensa que el complejo Atg16L1-Atg12-Atg5 funciona como un complejo ligasa E3 que actúa facilitando la lipidación de LC3. Ambos sistemas se localizan en la membrana del fagoforo una vez que se inicia la expansión, aunque de manera asincrónica, ya que el complejo Atg16L1-Atg12-Atg5 se disocia progresivamente de la membrana en expansión a medida que esta crece, mientras que LC3II gradualmente se localiza en ella. Finalmente ambos extremos de la membrana aislada del fagoforo se unen formando el autofagosoma.

Un paso importante en el ciclo autofágico es el reciclado de LC3. Atg4B, además de actuar procesando proteolíticamente el precursor de LC3, actúa como una enzima de deconjugación cortando la unión amida entre la proteína LC3 y el PE. Esta reacción es importante para el



Esquema 5. Ruta autofágica. Diversos estímulos inducen la activación de la ruta autofágica (Iniciación) dando lugar a la formación de la membrana aislada (Nucleación). A continuación, la membrana se expande engullendo parte del contenido citoplasmático hasta formar el autofagosoma (Expansión), para finalmente degradar su contenido tras la fusión con el lisosoma (Fusión y degradación). En el esquema se ilustran los mecanismos moleculares más importantes, que están descritos paso a paso en el texto.



Esquema 6. Autofagia selectiva. Un estrés producido por exceso de proteínas mal plegadas (ejemplo ilustrado), agregados, orgánulos dañados o parásitos intracelulares, activa una degradación selectiva de los mismos vía autofagia. Para ello, los sustratos a degradar son marcados extensamente con ubiquitina. Las proteínas receptoras de carga, p62 y NBR1, se unen específicamente a la ubiquitina y gracias a su dominio de unión a LC3, cargan estos sustratos en autofagosomas para su posterior degradación vía lisosomal. Modificado de Isakson y col., 2013.

reciclado de la proteína LC3 ya que mantiene en el citoplasma un reservorio de proteína LC3 I no conjugada. La reacción de delipidación de LC3II se da en los autofagosomas una vez formados y en las estructuras que se forman una vez que se unen al lisosoma (Yu y col., 2012).

3.1.4 Fusión y degradación

Después de la formación de los autofagosomas, su membrana externa se fusiona con la membrana de los lisosomas para formar los autolisosomas (Tanida, 2011). Este es un proceso poco conocido, en el que se sabe que la proteína Lamp-2 del lisosoma y la proteína de unión a GTP Rab7 parecen ser importantes. Además los autofagosomas también pueden fusionarse con la ruta endocítica, tanto a nivel de endosomas temprano como tardío, observándose que la interrupción de esta vía impide la degradación de los autofagosomas. Tras la fusión con el lisosoma, las enzimas de su interior degradan el contenido interno del autofagosoma. Finalmente los productos generados en esta degradación, aminoácidos y lípidos, son reciclados para generar nuevas macromoléculas.

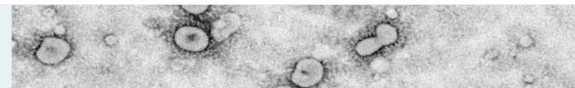
Una de las característica más importantes de los lisosomas es que tienen un contenido luminal muy ácido (pH 4,5-5,0) que ayuda a actuar eficientemente a las más de 50 hidrolasas acídicas que contiene, incluyendo proteasas,

peptidasas y lipasas entre otras. La degradación de autofagosomas ha sido bloqueada en numerosos ensayos utilizando drogas que impiden la acidificación de los lisosomas como la hidroxiclороquina (HCQ) o tratamientos con cloruro amónico (NH_4Cl).

Tradicionalmente se ha relacionado la acumulación de autofagosomas con procesos de inducción de autofagia, aunque hay que tener en cuenta que un aumento de autofagosomas no indica necesariamente un incremento en la autofagia ya que un resultado similar se observa cuando se bloquea la fusión de autofagosomas (Klionsky y col., 2012). En este sentido, la formación de autofagosomas, fusión al lisosoma, y reciclado se conoce como flujo autofágico.

3.2 Autofagia selectiva

Estudios relativamente recientes muestran evidencias de una degradación selectiva de agregados de proteínas mal plegadas (agrefagia) u organelas como peroxisomas (perofagia), mitocondrias (mitofagia) e incluso parásitos intracelulares (xenofagia) (Johansen y col., 2011; Stolz y col., 2014), en la que intervienen directamente proteínas receptoras de carga autofágica. En mamíferos se ha descrito la presencia de varias proteínas receptoras, siendo las más conocidas y estudiadas la proteína p62/SQSTM1 y



NBR1 (*neighbor of BRca1 gene*), las cuales cargan selectivamente sustratos ubiquitinados para ser degradados vía autofagia (Esquema 6).

La proteína p62 fue inicialmente conocida como secuestrosoma 1 por su habilidad de formar agregados, capacidad adquirida gracias a su dominio N-terminal PB1 el cual es un dominio de interacción proteína-proteína. Además se caracteriza por tener un dominio de unión a ubiquitininas (UBA) que le permite unir proteínas mono- o poliubiquitinadas, así como un dominio de interacción con LC3 (LIR). El motivo LIR media la unión de p62 a todos los miembros de la familia Atg8, incluidos LC3 y sus isoformas. Por su parte, NBR1 tiene también los dominios UBA y LIR, así como un dominio PB1 que le permite interactuar con p62, pero en este caso no le permite oligomerizar (Johansen y col., 2011; Stolz y col., 2014).

El esquema 6 muestra un modelo de actuación simplificado. La célula, tras un estrés, marca con ubiquitina aquellos sustratos causantes del mismo. La proteína p62 es reclutada a esta zona, e interacciona con el sustrato ubiquitinado a través de su dominio UBA. Además, gracias a su dominio PB1, las moléculas de p62 oligomerizan formando agregados de sustrato. NBR1 también participa y es reclutado a la zona donde se encuentra el sustrato a degradar. A su vez, la interacción de las proteínas p62 y NBR1 con LC3 produce el reclutamiento del fagoforo, y por lo tanto se inicia la expansión del autofagosoma rodeando al sustrato agregado.

3.3 Virus y autofagia

La autofagia tiene un papel fundamental en la supervivencia de la célula, actuando como un componente esencial en la defensa del hospedador frente a la infección, promoviendo la degradación de patógenos (xenofagia), actuando como efector de la respuesta innata o promoviendo la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo la presión selectiva mantenida por la autofagia ha ocasionado que algunos patógenos hayan desarrollado diversas estrategias para suprimir o

modular la ruta autofágica en su propio beneficio (Dong y col., 2013; Dreux y col., 2010; Jordan y col., 2012; Kudchodkar y col., 2009).

3.3.1 Mecanismos de inducción viral de la autofagia

En algunas infecciones virales, la propia interacción virus-célula estimula la señal que induce autofagia. En el caso del virus de la estomatitis vesicular (VSV), la glicoproteína de la envuelta media la entrada y la inducción de autofagia vía modulación de mTOR (Nakamoto y col., 2012; Shelly y col., 2009). Además, el receptor de superficie CD46 requerido para la entrada de una gran variedad de patógenos, incluidos el virus del sarampión, herpesvirus 6, adenovirus tipo B y D, y algunas bacterias patógenas, rápidamente induce autofagia mediada por la modulación del complejo Vps34/Beclin1 (Joubert y col., 2009).

Los componentes del virus también pueden inducir directa o indirectamente la ruta autofágica. Uno de los primeros sensores que se identificó como regulador de autofagia fue la quinasa citoplasmática PKR (*Protein kinase RNA-dependent*) que actúa como sensor de dsRNA. PKR fosforila la subunidad α del factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2 α), inhibiendo la traducción dependiente de cap de los transcritos y activando autofagia. Aunque el mecanismo preciso que relaciona la fosforilación de eIF2 α y la activación de la autofagia no se conoce, se ha sugerido que actúa a nivel del complejo Beclin 1 (Orvedahl y col., 2007). Como ejemplo, la fosforilación de eIF2 α mediada por PKR es fundamental para la inducción de la autofagia causada por el herpesvirus 1 (HVS-1) (Talloczy y col., 2002). Otro sensor que media la fosforilación de eIF2 α , es la quinasa PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*), la cual actúa bajo condiciones de estrés de retículo. Durante la traducción de muchos virus se sintetizan una gran cantidad de proteínas, así como proteínas mal plegadas, que pueden activar al sensor PERK. Se ha descrito que HCV produce la formación de autofagosomas por inducción de estrés de retículo (Sir y col., 2008).

3.3.2 Mecanismos de bloqueo de la autofagia por los virus

Diferentes virus codifican proteínas que antagonizan a la proteína Beclin 1. Los virus HVS-1 y gammaherpesvirus 68 codifican proteínas que se unen competitivamente a Beclin 1 inhibiendo el complejo Vps34/Beclin 1, y por tanto, bloqueando la iniciación de la autofagia (Leib y col., 2009; Sinha y col., 2008). Por otro lado, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV-1) y el virus de la gripe codifican las proteínas Nef y M2 respectivamente, que bloquean la maduración del autofagosoma de una manera dependiente de Beclin 1 (Gannage y col., 2009; Kyei y col., 2009). El virus vaccinia por su parte inhibe la autofagia mediante la inducción de una lipidación aberrante de LC3 y una conjugación directa de Atg3 y Atg12 (Moloughney y col., 2011).

3.3.3 Efecto antiviral de la autofagia. Regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa

La respuesta inmune innata está basada en el reconocimiento por parte de los receptores celulares PRRs (*pattern recognition receptors*) de proteínas o genomas extraños. Hay dos tipos de PRRs, los TLRs (*Toll-like receptors*) que se localizan en la superficie de la célula así como en los endosomas, y los receptores tipo RIG-I (*retinoic acid-inducible gene I*) que residen en el citoplasma (Dong y col., 2013; Dreux y col., 2010; Jordan y col., 2012). Ambos tipos de receptores inician una cascada de señalización que termina activando a los factores de transcripción IRF-3, IRF-7 y NF- κ B, los cuales disparan la respuesta innata. Algunos estudios muestran que la activación de los TLRs puede ser favorecida por proteínas autofágicas Atg.

La autofagia también puede cumplir un papel importante en la respuesta inmune adaptativa, facilitando la presentación de antígenos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I o II (Dong and Levine, 2013; Dreux and Chisari, 2010; Jordan and Randall, 2012).

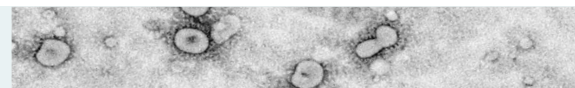
3.3.4 Efecto proviral de la autofagia

Los autofagosomas, por su naturaleza de vesículas membranosas, han sido propuestos como el sitio a partir del cual se originan las factorías de replicación de los virus RNA (Richards y col., 2013). Diversos estudios por microscopía confocal han mostrado colocalización entre la proteína LC3 y las proteínas asociadas a los complejos de replicación de muchos virus. Por ejemplo, se observó colocalización entre la proteína 3A, un componente del complejo de replicación del virus de la polio, con LC3 (Jackson y col., 2005). También se ha visto colocalización entre la proteína LC3 y los componentes de los complejos de replicación en infecciones con DENV (Shi y col., 2012).

En el caso de CVB3 el bloqueo de la fusión autofagosoma/lisosoma por inhibición farmacológica o por el silenciamiento de genes críticos en esta etapa, produce un aumento de la replicación del virus correlacionado con el aumento de la acumulación de autofagosomas en las células infectadas. De igual forma una inhibición en la formación de autofagosomas produce una disminución en la replicación del virus, mostrando que el virus necesita una óptima formación de autofagosomas para llevar a cabo su replicación (Richards y col., 2013; Shi y col., 2012; Wong y col., 2008).

3.4 Nidovirus y autofagia

La presencia de DMVs en las células que infectan los miembros del orden *Nidovirales* sugiere que estos virus pueden utilizar la ruta autofágica para generar las estructuras membranosas necesarias en la replicación (Maier y col., 2012). No obstante, la utilización de la ruta autofágica por estos virus está cuestionada. Los trabajos iniciales mostraron que MHV utiliza componentes de la ruta autofágica para formar sus complejos de replicación. En este ensayo se vio colocalización entre el marcador de autofagosomas LC3 y la proteína de la replicasa nsp8. Además la replicación de MHV se vio impedida en células deficientes



en Atg5 (Prentice y col., 2004a). Poco después, el mismo grupo mostró colocalización entre nsp8 y LC3 en SARS-CoV (Prentice y col., 2004b). Sin embargo, otros estudios no relacionados muestran que la replicación de MHV no requiere de una ruta autofágica activa al replicar de forma eficiente en células carentes de Atg5 (Zhao y col., 2007). Posteriormente, también se comprobó que la replicación de SARS-CoV no se ve afectada por la inducción de la autofagia, y ocurre de forma normal en células Atg5 $-/-$ con la autofagia limitada (Schneider y col., 2012). Además Snijder y colaboradores no observaron colocalización entre la proteína nsp3 de SARS-CoV y la proteína endógena LC3, así como tampoco con sus isoformas fusionadas a GFP (GFP-LC3A, GFP-LC3B y GFP-LC3C) expresadas de forma heteróloga (Snijder y col., 2006).

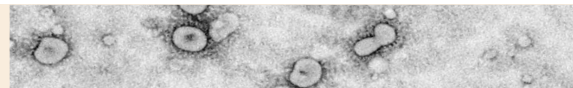
A su vez, estudios con el coronavirus aviar IBV indican que este virus es capaz de inducir autofagia al mostrar redistribución de la proteína LC3 desde su forma difusa a punteada en las células infectadas. No obstante no se observó colocalización entre el dsRNA y la proteína LC3, y el silenciamiento de Atg5 no mostró efecto sobre la replicación del virus (Maier y col., 2012; Maier y col., 2013a). Estudios con la proteína nsp6, expresada de manera individual, indican que esta proteína por si sola induce la formación de autofagosomas, los cuales se forman desde el RE vía omegasoma. Además, las proteínas nsp6 homólogas de MHV, SARS-CoV y el arterivirus causante del síndrome respiratorio y reproductivo

del cerdo (PRRSV) también inducen autofagia (Cottam y col., 2011). Varios estudios posteriores realizados en PRRSV, han indicado que la inducción de la ruta autofagia en la células infectadas por este virus juega un papel en la replicación del virus al verse afectado el título viral por la activación o inhibición la ruta (Chen y col., 2012; Liu y col., 2012; Sun y col., 2012).

Por otro lado, dos ensayos relacionados muestran que LC3 puede tener un papel independiente de autofagia en las células infectadas con el coronavirus MHV y con el arterivirus EAV (Monastyrska y col., 2013; Reggiori y col., 2010; Reggiori y col., 2011). En estos ensayos se observó colocalización entre la proteína endógena LC3 y los RTCs de estos virus, sin embargo la expresión heteróloga de GFP-LC3 no muestra colocalización. No obstante, lo más sorprendente fue observar colocalización entre LC3 y los RTCs en células Atg7 $-/-$, donde la lipidación de LC3 I a LC3II está impedida. Un fraccionamiento celular por gradientes de densidad mostró que solamente la proteína no lipidada LC3I se localiza junto a los RTCs. Además observaron colocalización entre los RTCs y algunos factores del RE asociados a degradación (ERAD) como EDEM1 y OS-9. Una observación anterior de que EDEM1 así como otros factores del ERAD eran reciclados a través de vesículas recubiertas de LC3I, denominadas EDEMosomes (Bernasconi y col., 2011; Calì y col., 2008), les hizo proponer estas estructuras como los posibles sitios de replicación y transcripción en los nidovirus (Noack y col., 2014).

O2

OBJETIVOS



Los torovirus son un grupo de virus entéricos pobremente caracterizados que infectan a distintas especies de animales domésticos y a los humanos, causando gastroenteritis y diarrea. Estos virus pertenecen al orden *Nidovirales*, el cual tiene entre sus miembros a importantes patógenos que causan serias enfermedades gastrointestinales y respiratorias en humanos. En este sentido, en los últimos tiempos se ha producido un gran interés en el estudio de las factorías membranosas que inducen estos virus, para llevar a cabo sus procesos de replicación y transcripción, ya que estas son estructuras esenciales en el ciclo de infección, y pueden ser importantes dianas para el desarrollo de agentes antivirales.

En este contexto, como objetivo principal de esta tesis nos propusimos **estudiar los complejos de replicación y transcripción del torovirus equino BEV**. Además, durante el desarrollo del mismo se observó que BEV induce autofagia a tiempos tardíos de infección y dado que algunos estudios sugieren que los virus RNA de cadena positiva explotan la ruta autofágica para facilitar su replicación, se decidió estudiar también el papel que cumple la autofagia en la infección con BEV. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. **Caracterizar los complejos de replicación y transcripción de los torovirus: estudiar su localización intracelular y el origen de las membranas implicadas.**
2. **Estudiar la biogénesis y la estructura de las factorías de replicación producidas por los torovirus.**
3. **Analizar el papel de la ruta autofágica en la infección de los torovirus.**

O3

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Material biológico

1.1 Células eucariotas

- Células E.Derm (NBL-6) (ATCC CCL-57): Células derivadas de la dermis de un caballo, con morfología de fibroblastos.
- Células MRC-5 (ATCC CCL-171): Fibroblastos derivados de pulmón fetal humano.
- 283T/17 [HEK 293T/17] (ATCC CRL-11268): Células epiteliales de riñón embrionario humano, derivadas de la línea 293 [HEK 293T] (ATCC CRL-1573) mediante la transfección del antígeno T del virus del simio 40 (SV40).
- HRT-18: Células derivadas de un adenocarcinoma rectal humano. Cedidas por el Dr. Hiroshi Tsunemitsu (National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Japan) (Kuwabara y col., 2007).

Las células E.Derm y MRC-5 fueron crecidas en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) y complementado con aminoácidos no esenciales (1 %) (Sigma-Aldrich), gentamicina (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich), penicilina (100 U/ml) (Sigma-Aldrich), estreptomycin (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich) y fungizona (0,5 µg/ml) (Gibco). Además, se añadió suero fetal bovino (FCS) (Sigma-Aldrich) al 15 % para las células E.Derm y al 10 % para las células MRC5 y 293T. Las células HRT-18 se crecieron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de FCS. Todas ellas fueron cultivadas a 37°C con 5 % de CO₂ y 98 % de humedad.

Todas las líneas celulares fueron conservadas en nitrógeno líquido con un agente crioprotector compuesto por 90 % de FCS y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Para su descongelación, los viales de células se introdujeron en un baño a 37°C y nada más descongelarse las células se diluyeron en DMEM con 10 % de FCS. Tras una centrifugación para eliminar los restos de DMSO, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron sobre placas

de cultivo. Una vez alcanzada la confluencia, las monocapas de células fueron despegadas de las placas de cultivo utilizando una solución de tripsina al 0,025 % y EDTA al 2 %, y sembradas nuevamente en placas a la dilución deseada.

1.2 Células procariotas

Para el crecimiento y purificación de los distintos plásmidos utilizados durante este trabajo se utilizaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa DH5α. Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa *E. coli* BL21(DE3), la cual expresa la polimerasa del fago T7 y es deficitaria en algunas proteasas.

Las cepas de *E.coli* fueron crecidas a 37°C con agitación en medio de cultivo Luria Broth (LB) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml) dependiendo del gen de resistencia que porte cada plásmido. Para el cultivo en placa de bacterias se añadió Bacto-Agar al 1,5 % al medio LB y se suplementó con el correspondiente antibiótico. Los clones bacterianos, obtenidos a partir de colonias aisladas, fueron conservados a -80°C en medio LB con 15 % de glicerol.

1.3 Virus

El virus objeto de estudio fue el torovirus equino, cepa Berne P138/72 (BEV), aislado de un caballo en Berna (Suiza) en 1972 por Weiss y colaboradores (Weiss y col., 1983), y adaptado a crecer en células equinas. El virus fue cedido por el Dr. Raoult de Groot (Utrecht University, Utrecht, Holanda) y posteriormente amplificado en nuestro laboratorio y guardado a pase 1 (P1) para su posterior uso.

Para generar los stocks de BEV se infectaron monocapas de células equinas crecidas en placas de 150 mm (20-25 placas) con BEV (P1) a una multiplicidad de infección de 0,01 unidades formadoras de placa (pfu) por célula. A las 24 hpi se recogieron los sobrenadantes de los cultivos infectados y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min para eliminar los restos celulares. Seguidamente, para concentrar el virus los sobrenadantes se sometieron a ultracentrifugación

a 20000 rpm durante 2 h. Los diferentes pellets se resuspendieron en tampón TEN (Tris-HCl 0,01 M pH 7,4, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM), se unificaron y se pasaron por un colchón de sacarosa al 20 % en TEN mediante ultracentrifugación a 20000 rpm durante 2 h. El pellet final se resuspendió en tampón TEN y se hicieron alícuotas que se guardaron a -80°C para su posterior uso. El virus recién concentrado fue titulado mediante el ensayo de formación de placas de lisis en medio sólido.

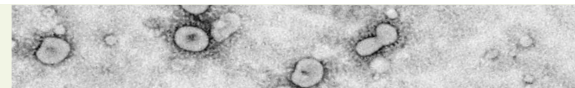
Por otra parte, también se realizó un estudio preliminar utilizando el torovirus bovino Aichi/2004 aislado en células HRT-18 por el grupo del Dr.

Hiroshi Tsunemitsu (National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, Japan), que nos fue amablemente cedido para nuestros estudios (Kuwabara y col., 2007). Una vez en nuestras manos, con el objetivo de intentar aumentar la concentración del virus, se hicieron pases ciegos sobre monocapas de células HRT-18 crecidas en placas de 12 pocillos utilizando 100 µl de sobrenadante del pase anterior para infectar. Los ensayos con este virus se realizaron infectando con el sobrenadante producido a pase 7. No se pudo determinar el título viral ni por ensayo de formación de placas de lisis ni por dilución límite.

2. Reactivos

2.1 Plásmidos

- pGEM-T Easy (Promega): Plásmido lineal con una timidina en cada uno de sus extremos 3', diseñado para clonar productos de PCR generados con Taq polimerasas.
- pRSET C (Life Technologies): Plásmido diseñado para la expresión en bacterias de proteínas heterólogas bajo el control del promotor del bacteriófago T7. Produce proteínas recombinantes con un *tag* de histidinas fusionado en su extremo N-terminal.
- pFastBac (Life Technologies): Plásmido para la expresión en células de insecto de proteínas recombinantes con un *tag* de histidinas.
- pGEM-T-BEV16053-19779: Contiene la secuencia nucleotídica del genoma de BEV comprendida entre los nucleótidos 16053-19779 (ver apartado 3.4 materiales y métodos).
- pRSET-Hel: Plásmido generado para la expresión de la helicasa de BEV en bacterias (ver apartado 3.4 de materiales y métodos).
- pRSET-RdRp-Nt: Plásmido generado para la expresión del fragmento N-terminal de la RdRp de BEV en bacterias (ver apartado 3.4 de materiales y métodos).
- pEGFP-C1 (Clontech): Plásmido diseñado para producir proteínas recombinantes fusionadas a GFP en su extremo N-terminal. Fue usado como control de transfección.
- pEGFP-LC3B: Plásmido cedido por el Dr. Tamotsu Yoshimori (Kabeya y col., 2000) (Addgene plásmido #21073) y utilizado para la expresión heteróloga de la proteína LC3 fusionada a GFP en su extremo N-terminal.
- pGFP-lpg 120: Plásmido cedido por la Dra. Jennifer Lippincott-shwartz (Patterson y col., 2002). Expresa la proteína lisosomal lamp1 fusionada a GFP.
- pDest-mCherry-EGFP-LC3B: Plásmido cedido por el Dr. Terje Johansen (Pankiv y col., 2007). Utilizado para la expresión heteróloga de la proteína quimera mCherry-GFP-EGFPB.
- pCL-ampho (Novus Biologicals): Plásmido de empaquetamiento retroviral.
- pSuperBeclin-1KD: Plásmido cedido por el Dr. William Maltese (Zeng y col., 2006). Se emplea para obtener un vector retroviral para la expresión de un RNA de interferencia (shRNA) frente a Beclin 1. La secuencia específica para el silenciamiento se muestra en la tabla I.



- pSuperControl: Plásmido para obtener un vector retroviral que codifica un shRNA de secuencia aleatoria, generado en el laboratorio a partir del vector pRETRO-SUPER (Netherlands Cancer Institute, NKI/AvL).
- pMDLg/pRRE: Plásmido cedido por el Dr. Didier Trono (Dull y col., 1998) (Addgene plásmido # 12251). Codifica las proteínas Gap y Pol de HIV-1. Se utiliza para la generación de pseudopartículas lentivirales junto a los plásmidos pRSV-Rev y pM2.G.
- pRSV-Rev: Plásmido cedido por el Dr. Didier Trono (Dull y col., 1998) (Addgene plásmido # 12253). Codifica la proteína Rev de HIV-1.
- pM2.G: Plásmido cedido por el Dr. Didier Trono (Dull y col., 1998) (Addgene plásmido # 12259). Codifica la glicoproteína G de la envuelta de VSV.
- pLKO.1-shRNA (Sigma-Aldrich): Conjunto de plásmidos para la producción de partículas lentivirales que expresan shRNAs específicos para silenciar las proteínas Beclin 1, Atg4B y LC3B (MISSION® shRNA Plasmid DNA). Las secuencias de cada shRNA se muestran en la tabla I.
- pLKO.1-shRNA control: Cedido por el Dr. Pablo Gastaminza (Friesland y col., 2013). Expresa un shRNA control sin homología de secuencia con mamíferos.

Tabla I. shRNA utilizados

| Plásmido | Secuencia shRNA ^a | Sec. Humana | Sec. Equina | Ref. ^b |
|--------------------------|---|--|----------------|-------------------|
| pSuperBeclin-1KD | 5'GGCAAGAUUGAAGACACAGTATC-TTGACCTGTGCTTCAATCTTGCC3' | MN_003766 | XM_001493225.2 | ---- |
| pRetroSuper-control | 5'CTGTGTCGTTGGTAACATTCAGAGATGTAGTTACCAACGAACA3' | Secuencia sin homología en mamíferos | | --- |
| pKLO-1 Beclin 1 shRNA 49 | 5'CCGGCCCGTGGAATGGAATGAGATTCTC GAGAACTCATTCATTCCACGGGTTTGTG3' | MN_003766 | XM_001493225.2 | TRCN0000033549 |
| pKLO-1 Atg4B shRNA 800 | 5'CCGGGAAAGATTCTTCGACTCAGAACTC GAGTCTGAGTCGAAGAATCTTCTTTTGTG3' | NM_013325.4 | XM_001497765.1 | TRCN0000073800 |
| pKLO-1 Atg4B shRNA 801 | 5'CCGGCGGTTTGCTGAGTTTGAAGATCTC GAGATCTTCAAACAGCAAAACCGTTTGTG3' | NM_013325.5 | XM_001497765.1 | TRCN0000073801 |
| pKLO-1 Control TT | 5'CCGGTAATTCTCCGAACGTGTACGTTTCAA GAGACGTGACACGTTCCGGAGAATTTTGTG3' | Secuencia de Thermotoga sp. Sin homología en mamíferos | | --- |
| pKLO-1 LC3B shRNA_0 | 5'CCGGCGAACAAGAGTAGAAGATGTCTC GAGACATCTTCTACTCTTTGTTTGTG3' | NM_022818.2 | XM_001493613.3 | TRCN0000151769 |
| pKLO-1 LC3B shRNA_1 | 5'CCGGCCTGACCATGTCAACATGAGTCTC-GAGACTCATGTTGACATGGTCAGGTTTTTGTG3' | NM_022818.2 | XM_001493613.3 | TRCN0000155417 |
| pKLO-1 LC3B shRNA_2 | 5'CCGGCAAGATAATTAGAAGCGCTTCTC-GAGAAGCGCCTTCTAATTATCTTGTTTTGTG3' | NM_022818.2 | XM_001493613.3 | TRCN0000150377 |
| pKLO-1 LC3B shRNA_3 | 5'CCGGCCCGGTGATAATAGAACGATACTC-GAGTATCGTTCTATTATCACCAGGTTTTTGTG3' | NM_022818.2 | XM_001493613.3 | TRCN0000153522 |
| pKLO-1 LC3B shRNA_4 | 5'CCGGGAGTAGAAGATGTCCGACTTACTC-GAGTAAGTCGGACATCTTCTACTCTTTTGTG3' | NM_022818.2 | XM_001493613.3 | TRCN0000153286 |
| pKLO-1 LC3B shRNA_5 | 5'CCGGGTTCCGGGATGAAATGTGAGTCTC-GAGACTGACAATTCATCCGAACTTTTTGTG3' | NM_022818.2 | XM_001493613.3 | TRCN0000152948 |

^a En subrayado se muestra la secuencia específica de cada gen. Estos shRNA están diseñados para silenciar genes humanos mostrando en rojo aquellos nucleótidos que difieren entre las secuencias humana y equina.

^b Referencia MISSION® shRNA Plasmid DNA (Sigma-Aldrich)

2.2 Anticuerpos

Todos los anticuerpos primarios o secundarios utilizados durante este estudio están descritos en la siguiente tabla (tabla II).

Tabla II. Relación de anticuerpos empleados

| Anticuerpo | Antígeno | Uso ^a | Esp ^b . | Tipo ^c . | Referencia |
|------------------------------|--|------------------|--------------------|---------------------|--|
| Anti-N | Proteína N de BEV | IF WB | Rb | AcP | Producido en nuestro laboratorio (Garzon y col., 2006) |
| Anti-M_{Nt} | Péptido sintético. Extremo N-terminal de la proteína M de BEV (aminoácidos 2-13) | IF WB | Rb Rt | AcP | Producido en nuestro laboratorio (Garzon y col., 2006) |
| Anti-M_{Ct} | Péptido sintético. Extremo C-terminal de la proteína M de BEV(aminoácidos 222-233) | IF WB | Rb Rt | AcP | Producido en nuestro laboratorio (Garzon y col., 2006) |
| Anti-PLP | Péptido sintético (ATDFETPRPRC) basado en la secuencia de la proteasa PLP del BToV Brescia | IF | Rt | AcP | Producido en nuestro laboratorio |
| Anti-Hel | Helicasa de BEV (aminoácidos 5411-5968 de la pp1ab) | IF | Rb | AcP | Producido durante este estudio |
| Anti-RdRp | Fragmento N-terminal de la RdRp de BEV (aminoácidos 4576-4828 de la pp1ab) | IF WB | Rb | AcP | Producido durante este estudio |
| Anti-M^{pro} | Péptido sintético. Extremo C-terminal de la M ^{pro} de BEV, KPL (KPLQYFHVPSFWQPFFKKQ) | IF WB | Rb Rt | AcP | Producido durante este estudio. ^d |
| Anti-Hel 155 | Péptidos sintéticos de la región de la Hel de BEV, NDR (NDRTYRNPVWNKDDSD) y PEP (PEPKYRYFGMEKQ) | IF | Rb | AcP | Producido durante este estudio |
| Anti-dsRNA K1 | Dúplex de RNA de 40 pares de bases | IF | Mo | AcM | English&Scientific Consulting kft. |
| Anti-BrU UI-4 | Bromodeoxiuridina o bromouridina | IF | Mo | AcM | Life Technologies |
| Anti-Calnexina | Péptido sintético cerca del extremo C-terminal de la calnexina de perro. | IF | Rb | AcP | Enzo Life Sciences |
| Anti-PDI (1D3) | Péptido sintético cerca del extremo C-terminal de la proteína PDI (Protein disulfide isomerase) de rata. | IF | Mo | AcM | Enzo Life Sciences |
| Anti-ERGIC 53 (G1/93) | Proteína p53 humana del compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC-p53) | IF | Mo | AcM | Enzo Life Sciences |
| Anti-TGN-46 | Glicoproteína TGN-46 humana. | IF | Sh | AcP | AbD serotec |
| Anti-EAA1 (14/EEA1) | Proteína EAA1 humana (Antígeno 1 del endosoma temprano). | IF | Rb | AcM | BD Biosciences |



| | | | | | |
|-----------------------------|--|----------|----------|-----|-------------------|
| Anti-S1R (F-5) | Receptor Sigma 1 humano. | IF | Rb | AcM | Santa Cruz |
| Anti-pan-cadherina | Péptido sintético del extremo C-terminal de N-cadherinas de pollo. Utilizado como marcador de proteína anclada a membrana | WB | Rb | AcP | Sigma-Aldrich |
| Anti-GAPDH | Péptido sintético cerca del extremo C-terminal de la Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa humana. Utilizado como marcador citoplasmático. | WB | Rb | AcM | Cell Signalling |
| Anti-LC3B | Péptido sintético de la proteína LC3B humana (aminoácidos 2-15). | IF WB | Rb | AcP | Sigma-Aldrich |
| Anti-LC3B (LC3B-6) | Péptido sintético del extremo N-terminal de la proteína LC3B humana. | IF WB | Mo | AcM | Sigma-Aldrich |
| Anti-Beclin1 (H-300) | Región N-terminal de la proteína Beclin1 humana (aminoácidos 1-300) | WB | Rb | AcP | Santa Cruz |
| Anti-Atg4B | Péptido sintético del extremo N-terminal de la proteína Atg4B humana (aminoácidos 6-22). | WB | RB | AcP | Sigma-Aldrich |
| Anti-p62 (H-290) | Fragmento de la proteína p62/SQSTM1 humana (aminoácidos 151-440) | IF | Rb | AcP | Santa Cruz |
| Anti-β-Actina (C4) | Proteína β-actina aviar. Utilizado como control de carga. | WB | Mo | AcM | Santa Cruz |
| Anti-α-Tubulina | Subunidad alpha de los microtubulos. Utilizado como control de carga | WB | Rb | AcM | Cell Signaling |
| Anti-IgG-HRP | Anticuerpos secundarios generados en cabra o burro frente a IgG de ratón, conejo o rata, conjugados con la peróxidasa de rábano. | WB | Sh Do | AcP | Sigma-Aldrich |
| Anti-IgG-AlexaFluor | Anticuerpos secundarios generados en cabra o burro frente a IgG de ratón, conejo o rata, conjugados con AlexaFluor 488, 546, 594 o 647 | IF | Sh Do | AcP | Life Technologies |

^a Uso del anticuerpo en inmunofluorescencia (IF) o inmunoblot (WB). ^b Especie del anticuerpo: Conejo (Rb), rata (Rt), ratón (Mo), cabra (Sh) y Burro (Do). ^c Tipo de anticuerpo: anticuerpo monoclonal (AcM) o anticuerpo policlonal (AcP). ^d Previamente descrito por Smits y col. (Smits y col., 2006)

2.3 Otros reactivos

Tabla III: Otros reactivos

| Reactivo | Características | Referencia/compañía |
|---|---|---------------------|
| MitoTracker Red 580 | Sonda fluorescente para teñir mitocondrias activas. | Life Techtnologies |
| LysoTracker Red DND-99 | Sonda fluorescente para teñir orgánulos ácidos como los lisosomas | Life Techtnologies |
| DAPI | Sonda fluorescente para teñir dsDNA | Life technologies |
| 3-Methyladenina (3-MA) | Compuestos que actúan como inhibidores de la ruta autofágica en sus primeros estadios. | Sigma-Aldrich |
| Wortmanina (Wn) | | Sigma-Aldrich |
| Hidroxiclороquina (HCQ) | Compuestos utilizados como inhibidores de la ruta autofágica en estadios tardíos. | Sanofi-Synthelabo |
| Cloruro amónico (NH₄Cl) | | Sigma-Aldrich |
| EBSS | Medio de cultivo conocido como de ayuno utilizado para disparar la ruta autofágica. | Sigma-Aldrich |
| Actinomicina D | Compuesto que impide la proliferación celular al formar complejos estables con el DNA que bloquean el funcionamiento de la RNA polimerasa II. | Sigma-Aldrich |
| 5-Bromouridina | Análogo de la uridina | Sigma-Aldrich |

3. Metodología

3.1 Infección

3.1.1 Infección en medio líquido

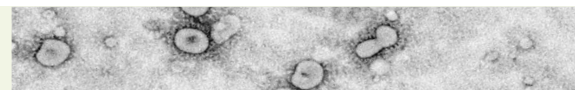
Todos los ensayos realizados con BEV, salvo que en el texto se indique lo contrario, se realizaron a una multiplicidad de infección de 2,5 pfu por célula. Para ello, se inocularon monocapas de células E.Derm o MRC5 con la correspondiente cantidad de BEV diluido en un volumen mínimo de DMEM durante 1 h a 37°C con agitación cada 15 min. Pasado este tiempo se retiró el inóculo y se mantuvieron las células en DMEM con 2 % de FCS durante el tiempo estimado de ensayo.

Las infecciones con el aislado Aichi/2004 de BToV se hicieron en células HRT-18, crecidas directamente en placas de 24 pocillos o sobre cristales cubreobjetos (~2x10⁵ células/pocillo),

excepto las realizadas para el estudio por microscopía electrónica (ver apartado 3.8.2). Se utilizó un volumen 25µl de sobrenadante Aichi/2004 (pase 7) por pocillo en medio RPMI. La adsorción viral se realizó de manera similar a como se hizo con BEV, y las células se mantuvieron en medio RPM con 2 % de FCS hasta su procesamiento.

3.1.2 Infección en medio sólido. Titulación por ensayo de formación de placas de lisis.

Los sobrenadantes de las células infectadas con BEV fueron titulados por triplicado. Para ello, se prepararon diluciones seriadas 1/10 de los sobrenadantes que fueron utilizados para infectar por triplicado monocapas de células E.Derm sembradas el día anterior en placas de 12 pocillos. Tras una hora de adsorción del virus, se retiró el inóculo y se añadió sobre las células una mezcla 1:1 de medio de cultivo (DMEM 2x con 2 % de FCS y 0,05 mg/ml de DEAE-dextrano) y agar al 1,9 %. A las 72 hpi se retiró el medio con agar y se tiñeron



las células con una solución de cristal violeta al 1 % en 2 % de metanol. El exceso de cristal violeta se retiró con agua y las placas se dejaron secar. Una vez secas se contó el número de placas de lisis y se expresó el título viral como pfu/ml.

3.2 Cuantificación de RNA viral

Los ensayos comparativos de producción de RNA viral fueron realizados mediante RT-PCR cuantitativa.

3.2.1 Extracción de RNA

El RNA total se extrajo a partir de monocapas de células E.Derm ($\sim 1.5 \times 10^6$ células) infectadas con BEV o no infectadas, recogidas a los tiempos de infección indicados en cada ensayo. Para ello, las monocapas de células se lavaron 3 veces con tampón fosfato (PBS) y se procesaron con el *kit* RNeasy Mini (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lisis celular se llevó a cabo directamente sobre la monocapa utilizando el tampón de lisis del kit. En aquellos ensayos donde se analizaron diferentes tiempos de infección los lisados se mantuvieron a -80°C hasta el posterior procesamiento de todas las muestras en conjunto. Una vez finalizada la extracción, el RNA purificado fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y fue conservado hasta su posterior uso a -80°C . En cada ensayo se procesaron 2 réplicas por muestra.

3.2.2 RT-PCR cuantitativa

El paso de transcripción reversa (RT) se llevó a cabo con 500 ng de RNA, una mezcla de hexámeros aleatorios (Roche Applied Science) y la enzima retrotranscriptasa SuperScript III (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El cDNA resultante fue amplificado y cuantificado mediante PCR cuantitativa con SYBR Green utilizando el reactivo comercial Power SYBR Green Master Mix (Life Technologies) en un termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para

detectar y cuantificar el RNA viral de BEV se utilizó una pareja de cebadores, de la región codificante de la proteína N (N_F : 5'-ACAGCGTGACCCAGCTTTTC-3' y N_R : 5'-TTTGACGGCTGCGATTCTG-3'). Además, se cuantificó el mRNA correspondiente a la enzima hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1) para la normalización de los datos ($HPRT1_F$: 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3' y $HPRT1_R$: 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3').

En primer lugar se hizo un ensayo de optimización de la concentración de las parejas de cebadores, tras el cual se decidió utilizar una concentración final 100 mM y 300 mM para N_F y N_R , y 300 mM y 100 mM para H_F y N_R para cada ensayo de PCR, respectivamente. A continuación, para preparar las curvas patrón se prepararon diluciones seriadas de los plásmidos correspondientes que contienen la secuencias amplificadas con cada pareja de cebadores, generados previamente mediante el clonaje de dichas secuencias en el vector pGEM-T Easy (Promega). Se utilizaron curvas patrón (10^7 a 10^2 moléculas) que cumplen los siguientes parámetros: una regresión lineal entre 0,99-1 y un valor de la pendiente próximo a -3,2. Cada ensayo se realizó en una misma placa incluyendo las dos réplicas de las muestras a analizar, las curvas patrón y los controles negativos de los procesos de extracción de RNA, RT y PCR con duplicados de cada uno de ellos. Los datos se analizaron con el programa 7500 versión 2.0.6, correspondiendo los valores presentados a unidades relativas tras ser normalizadas frente a los valores de HPRT.

3.3 SDS-PAGE e inmunoblot

Los extractos celulares fueron obtenidos tras lisar directamente las monocapas de células, infectadas con los virus BEV o Aichi/2004, o no infectadas, en tampón de carga Laemmli (Laemmli, 1970) con β -mercaptoetanol al 5 %, y fueron mantenidos a -20°C hasta su posterior análisis. Las proteínas fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida [29:1]) (Bio-Rad) en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato

sódico (SDS-PAGE). Para ello, los extractos celulares fueron hervidos durante 5 min y cargados en geles de poliacrilamida al 10 % para la mayoría de las proteínas. En el caso de LC3B, para resolver sus dos formas, LC3BI y LC3BII, se requieren geles al 12 %. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante electrotransferencia en condiciones semisólidas. Para comprobar la correcta transferencia de las proteínas, estas se tiñeron de forma reversible con una solución de rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich) al 0,2 % en una solución de ácido acético al 3 %. Seguidamente las membranas se bloquearon mediante su incubación en leche desnatada al 5 % diluida en solución TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM con 0,05 % de Tween-20) durante 1 h con agitación y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla II) diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y en agitación. Tras tres lavados en TBS-T a intervalos de 10 min, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla II) acoplado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente, y se lavaron nuevamente 3 veces con TBS-T. Para la incubación con el anticuerpo frente a GAPDH se empleó albumina de suero bovino (BSA) en vez de leche desnatada en todo el proceso. Las proteínas fueron detectadas utilizando un kit para detectar quimioluminiscencia (ECL, GE Health Care) y películas de autoradiografía (Agfa o Kodak).

3.3.1 Análisis cuantitativo de proteínas

Para cuantificar la cantidad relativa de proteína en cada gel se realizó un análisis por densitometría de las bandas de interés utilizando el *software* libre ImageJ/Fiji. Para ello se utilizó una película de autoradiografía con una exposición apropiada, sin bandas saturadas, que fue escaneada, y la imagen digital se importó y se cuantificó utilizando el método descrito en la siguiente página web: <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>. Los valores obtenidos para cada proteína de interés fueron relativizados con respecto a los valores de las

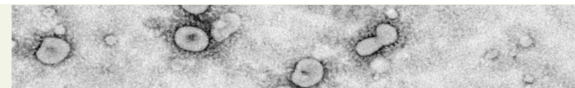
proteínas celulares tubulina o actina, utilizadas como control de carga.

3.4. Producción de sueros frente proteínas del complejo de la replicasa de BEV

Para este estudio se han generado anticuerpos policlonales específicos frente a proteínas de la replicasa de BEV. Los anticuerpos policlonales frente a la helicasa (anti-Hel) y a la RdRp (anti-RdRp) se obtuvieron tras inmunizar conejos (*New Zealand White*) con una proteína recombinante expresada en *E.coli* que contiene el dominio predicho de la Hel de BEV (Tabla II) o con un fragmento de la RdRp (Tabla II), respectivamente. La construcción de los plásmidos de expresión, la producción y purificación del antígeno y la inmunización de los animales se describe en los apartados siguientes. Además, se obtuvieron dos sueros frente a la proteasa M^{pro} (anti-M^{pro}), uno en conejos y otro en ratas, mediante la inmunización subcutánea de los animales con el péptido sintético KPLQYFHVPSFWQPFKKQ-COOH acoplado a KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*)

3.4.1 Generación de los plásmidos para la expresión en bacterias

La región codificante específica empleada para expresar la proteína Hel fusionada a un *tag* de histidinas fue generada mediante PCR utilizando los cebadores 5'Hel-BamHI (5'GGATCCAGGCAAATTTTCGATAAAGTGTG) y 3'Hel-XbaI (5'TCTAGAGCTGCTTCTCCATGCCAAAATA) y la DNA polimerasa Platinum Taq (Life Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como molde se utilizó el plásmido pGEM-T-BEV16053-19779 que contiene la secuencia nucleotídica que abarca desde el nucleótido 16053 al 19779 del genoma de BEV (El genoma completo de BEV fue ensamblado *in silico* utilizando las secuencias nucleotídicas de BEV depositadas en Genbank: DQ310701.1, X52374.1, X52506.1, D00563.1, X52505.1, X56016.1, X52375.1 M33503.1 y M33502.1). El fragmento de PCR fue purificado con el *kit* comercial QIAquick PCR



Purification Kit (QIAGEN) e insertado en el vector de clonación pGEM-T-easy vector (Promega) utilizando la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs). Dado que nuestro objetivo inicial era expresar la proteína Hel en células de insecto, el plásmido resultante fue digerido con *BamH* I y *Xba* I para clonar la secuencia de la Hel en el vector pFasBac (Life Technologies) en fase con la secuencia del *tag* de histidinas. En vista de que los intentos de expresión en células de insecto resultaron negativos, decidimos utilizar el sistema de expresión en bacterias. Para ello, el plásmido pFasBac-Hel se digirió con *BamH* I y *Hind* III y el fragmento correspondiente a la secuencia de la Hel se clonó en el vector de expresión bacteriano pRSET-C, en fase con la secuencia del *tag* de histidinas, obteniéndose así el vector pRSET-Hel.

Para expresar un fragmento de la proteína RdRp fusionado al *tag* de histidinas (RdRp-Nt) se utilizó una estrategia similar. Brevemente, se realizó una PCR con los cebadores 5'BamHI-RdRp (5'GGATC-CGCGCATGCAGACATCTTTGTTTTCAAATGGCGCAT-AC) y 3'NcoI-RdRp (5'CCATGGCTCGAGTTAGGCTG-GATCGCTCAAAAACGGTCTTAC) y como molde se utilizó el vector pGEMT-BEV 16053-19779. El producto de PCR fue subclonado en el vector pGEM-T Easy, y el plásmido resultante fue digerido con *BamH* I y *Nco* I para clonar el fragmento N-terminal de la RdRp en el vector de expresión pRSET-C en fase con la secuencia del *tag* de histidinas. Así se obtuvo el plásmido pRSET-RdRp-Nt.

Todos los fragmentos clonados en los plásmidos obtenidos fueron secuenciados para comprobar que contenían las secuencias correctas.

3.4.2 Expresión y purificación del antígeno

Para obtener bacterias con capacidad para expresar las proteínas Hel y RdRp-Nt de BEV se transformaron células competentes de la cepa *E.Coli* BL21(DE3) con los plásmidos pRSET-Hel y pRSET-RdRp-Nt, se sembraron en placas LB suplementadas con 50 µg/ml de ampicilina y 35 µg/ml de cloranfenicol y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para los ensayos de

expresión de cada proteína, a partir de una colonia transformante se inoculó 10 ml de LB suplementado con antibióticos y se incubó en agitación (250 rpm) a 37°C, toda la noche. Al día siguiente, los 10 ml de cultivo fueron inoculados en una matraz con 250 ml de LB suplementado con antibióticos, y se incubó en agitación (250 rpm) a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O._{600 nm}) de 0,4 - 0,6 se indujo la expresión con 1 mM de IPTG y se mantuvo el cultivo durante 4 h a 37°C. Después las células fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 3 min a 4°C, y lisadas mediante sonicación en tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y NaCl 500 mM) suplementado con inhibidores de proteasas (cOmplete protease inhibitor cocktail; Roche). Debido a que estas proteínas fueron muy insolubles, ambas se purificaron en condiciones desnaturalizantes. Para ello, los pellets obtenidos tras la lisis celular fueron lavados con tampón A con 1 M de urea, y posteriormente solubilizados con tampón A con 8 M de Urea. Tras descartar el material insoluble, los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad con una resina de cobalto (Talon Metal affinity resin; Clontech). La proteína RdRp fue eluída con tampón A con 8 M de urea y 100 mM de imidazol, dializada frente a tampón A con concentraciones decrecientes de urea y finalmente concentrada con un *SpeedVac*. La proteína concentrada se resuspendió en tampón A, y se determinó su concentración mediante el uso del Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific). La concentración de la proteína RdRp-Nt purificada fue de 1,2 µg/ml.

En el caso de la proteína recombinante Hel solo una pequeña parte fue soluble en tampón A con 8 M de urea. Por esta razón, después del lavado con tampón A con 1 M de urea, el pellet resultante se resuspendió en tampón de carga Laemmli en condiciones reductoras y se sometió a separación electroforética con SDS-PAGE. Tras la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomassie (Sigma-Aldrich). Una vez desteñido el

gel, se identificó la banda correspondiente a la proteína Hel de 67 kDa, se cortó el fragmento de gel y se metió en una membrana de diálisis para proceder a la electroelución de la proteína en una solución que contiene 50 mM de NH_4HCO_3 (pH 9,0) y 0,1 % SDS. La electroelución se llevó a cabo a voltaje constante de 50 V durante 20 h tal como describe Vázquez y colaboradores (Vazquez y col., 1998). Finalmente la proteína fue concentrada en un *SpeedVac*, precipitada con metanol-acetona (50 % [vol/vol]) y el pellet resultante fue resuspendido en tampón A. La concentración de la proteína Hel purificada fue de 1,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.4.3 Obtención de los sueros específicos

La inmunización y el sangrado de los animales fueron realizados por el servicio de animalario del Centro Científico y Tecnológico de la Universidad de Barcelona. Siguiendo los protocolos estándar, para cada suero se realizaron 3 inoculaciones por animal, una inicial de 500 μg de antígeno con adyuvante completo de Freund, y dos de refuerzo de 250 μg cada una, utilizando adyuvante incompleto de Freund.

En los primeros análisis observamos que los sueros anti-Hel y anti-RdRp reconocían de forma específica el antígeno correspondiente, pero presentaban también una reactividad inespecífica, por lo que fueron purificados por afinidad al antígeno inmovilizado en nitrocelulosa (Robinson y col., 1988). Para ello, se utilizó proteína purificada (100 μg), que fue sometida a electroforesis, transferida a una membrana de nitrocelulosa y teñida con rojo Ponceau. La zona de la nitrocelulosa que contenía la banda específica del antígeno fue escindida y bloqueada en TBS con 10 % FCS. Seguidamente, la tira de antígeno fue incubada con el suero diluido (1:1) en TBS con 10 % FCS a 4°C durante toda la noche, y a continuación se lavó con TBS-T (TBS con Tween 20 al 0,05 %). La elución de las inmunoglobulinas a partir de la nitrocelulosa se realizó con 0,2 M de glicina-HCl (pH 2,5) durante 10 min, y rápidamente se neutralizó el pH de esta solución añadiendo Tris-HCl 1 M (pH 8,0) con 20 % de FCS.

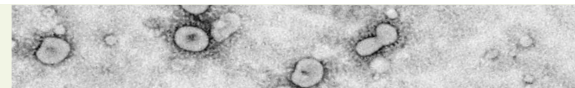
3.4.5 ELISA

La reactividad de los sueros de la M^{pro} generados en conejos y ratas fue comprobada mediante ELISA utilizando el péptido sintético KLQ utilizado para la inmunización (Ver tabla II).

Para ello, se tapizaron por duplicado los pocillos de una placa de 96 pocillos (Maxisorp; Nunc) con 50 μl del péptido correspondiente diluido en PBS a una concentración de 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Tras la incubación durante toda la noche a 4°C, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS-T (PBS al 0,05% de Tween) y se bloquearon con 100 μl de BSA al 3 % en PBS-T durante 1 h a 37°C. A continuación se retiró la solución de bloqueo y se añadió el suero diluido 1/100 en PBS-T con 1 % de BSA durante 1 h a 37°C. Tras finalizar la incubación, se lavaron los pocillos 4 veces con PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido 1/1000 en PBS-T con 1 % de BSA y se mantuvo durante 1 h a 37°C. Se lavaron nuevamente los pocillos 4 veces con PBS-T y se añadió la solución de revelado OPD Fast (Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los valores de absorbancia se midieron a 492 nm en un espectrofotómetro multicanal (Titertek Multiscan MCC/340).

3.5 Transfección en células equinas

Para la transfección de las células equinas probamos diferentes agentes comerciales basados en la formación de liposomas, siguiendo las recomendaciones de cada fabricante, y utilizando diferentes concentraciones de plásmido y ratios de plásmido:agente de transfección. Para estos ensayos preliminares se utilizó el plásmido pEGFP-C1 (Clontech) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). Finalmente establecimos unas condiciones óptimas de transfección para las células E.Derm que se basan en la utilización de la lipofectamina 2000 (Life Technologies) como agente de transfección, 1 μg de plásmido por cada 1.2×10^6 células aproximadamente, y un ratio 1:1 de DNA:lipofectamina.



Las transfecciones se llevaron a cabo en células sembradas el día anterior sobre placas de 12 pocillos y crecidas a una confluencia de un 80 %. La lipofectamina se diluyó en 50 μ l de Opti-MEM (Life Technologies) y tras 5 min de incubación se añadió gota a gota sobre la solución de DNA previamente diluida en 50 μ l de Opti-MEM. La mezcla DNA/agente de transfección se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Mientras tanto, las células fueron lavadas con DMEM libre de antibióticos y suero, y fueron mantenidas con 900 μ l de este medio. Transcurrido el periodo de incubación, se añadió sobre las células 100 μ l de la mezcla DNA/agente de transfección. A las 5 h, se retiró el medio de transfección y se mantuvieron las células en el medio de cultivo habitual (DMEM con 15 % de FCS). Comprobamos que el periodo entre las 40 y las 48 h post-transfección es el tiempo idóneo para llevar a cabo los distintos ensayos, ya que existe un compromiso entre el número de células que expresan y los síntomas de toxicidad.

3.6 Fraccionamiento subcelular

A partir de células E.Derm infectadas o no infectadas se llevó a cabo un fraccionamiento para separar las estructuras membranosas de la fracción citosólica, mediante centrifugación diferencial siguiendo protocolos previamente establecidos (Brockway y col., 2003; Sims y col., 2000) con pequeñas variaciones. Para ello, utilizamos monocapas de células E.Derm crecidas sobre 4 placas de 150 mm ($\sim 25 \times 10^6$ células/placa) e infectadas durante 16 h, o no infectadas, que fueron lavadas con PBS, raspadas en este mismo tampón y recolectadas mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. El pellet de células fue resuspendido en tampón Tris-sacarosa frío (10 mM Tris [pH 7,2] y 200 mM sacarosa) con inhibidor de proteasas (cOmplete protease inhibitor cocktail; Roche), y homogeneizado con un homogeneizador Dounce de 10 ml. La homogeneización se realizó dando entre 50-100 golpes de pistón y comprobando que más de un 90 % de las células estuvieran rotas y con el núcleo liberado, para ello

se observó el homogeneizado en una cámara de Neubauer. Seguidamente, la fracción nuclear fue separada mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante resultante fue centrifugado de nuevo para eliminar restos de núcleos o células que pudieran quedar. El nuevo sobrenadante fue ultracentrifugado a 100000 rpm durante 15 min a 4°C en una ultracentrifuga de mesa Beckman con un rotor Sorvall TLA-120, para separar las membranas celulares del citosol. Este proceso se repitió una vez más para eliminar los posibles restos membranosos que pudieran quedar, guardando el sobrenadante resultante como material citosólico (S100). De igual forma, el pellet resultante de la primera ultracentrifugación fue lavado en tampón Tris-sacarosa frío y ultracentrifugado de nuevo, para finalmente, ser resuspendido y guardado como fracción membranosa (P100). La fracción P100 fue resuspendida durante toda la noche a 4°C en tampón Tris-sacarosa en un volumen igual al de la fracción S100. Ambas fracciones, S100 y P100 fueron conservadas a -80°C hasta su posterior análisis mediante inmunoblot.

3.7 Microscopia de fluorescencia

3.7.1 Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron células E.Derm, MRC5 o HRT-18 crecidas sobre cristales cubreobjetos a una confluencia aproximada del 70 % ($\sim 5 \times 10^5$ células/pocillo). Las células infectadas con BEV o Aichi/2004, o no infectadas, fueron fijadas a los tiempos indicados con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Para la utilización de los anticuerpos S1R y p62, las células se fijaron en metanol frío durante 15 min. Después de 3 lavados en PBS las células se incubaron durante 10 min con 50 mM de NH_4Cl y se permeabilizaron durante 5 min con Triton X-100 al 0,5 % en PBS. A continuación las células se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron con una solución de bloqueo compuesta por PBS con 20 % de FCS durante 30

min, y posteriormente se incubaron con la mezcla de anticuerpos primarios (Tabla II) diluidos en la solución de bloqueo durante 1 h a 37°C en una cámara húmeda. Posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS y de nuevo incubadas con la mezcla correspondiente de anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla II) y DAPI durante 1 h a 37°C en una cámara húmeda y en condiciones de oscuridad. Tras la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS y por último se montaron sobre portaobjetos de vidrio utilizando ProLong® Gold anti-fade (Life Technologies). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Leica TSC SP5 con una distancia de pasada en el eje z de 0,5 μm (*z-step size*)

3.7.2 Tinción con sondas fluorescentes

En algunos ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron sondas fluorescentes para marcar las mitocondrias o los lisosomas. Células E.Derm crecidas sobre cristales cubreobjetos, e infectadas con BEV o no infectadas, fueron incubadas con las sondas fluorescentes Mitotracker o LysoTracker (Tabla III) durante 30 minutos antes de ser fijadas. Para ello se retiró el medio de cultivo de las células y se añadió el Mitotracker o el LysoTracker a una concentración de 500 nM diluido en DMEM previamente atemperado a 37°C. Después de la tinción con las sondas fluorescentes, las células se fijaron con PFA al 4 %, y se procesaron siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia.

3.7.3 Marcaje con 5-Bromouridina

Para marcar el RNA viral de nueva síntesis las células E.Derm infectadas con BEV o no infectadas se trataron con una solución de 5-bromouridina (BrU) 5 mM y actinomicina D (ActD) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tabla III) preparada en medio de cultivo DMEM con FCS al 2 % al tiempo post-infección indicado. Tras 1 h de incubación las células se fijaron con PFA al 4 %, se lavaron 3 veces con PBS y se procesaron siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia. La detección de la BrU se realizó utilizando un anticuerpo específico anti-BrU (Tabla II)

3.7.4 Expresión de proteínas fluorescentes

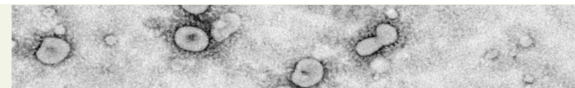
Para observar la distribución de la proteína lamp1 utilizamos un plásmido que expresa dicha proteína fusionada a la proteína GFP (pGFP-lpg 120). Para ello, las células E.Derm crecidas sobre cristales cubreobjetos (70 % de confluencia), fueron transfectadas con dicho plásmido tal y como se indica en el apartado 3.5 de materiales y métodos. A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con BEV o no infectadas, se fijaron a las 16 hpi con PFA al 4 %, y se procesaron siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia para inmunomarcar los RTCs del virus con el anticuerpo anti-M^{pro}. Un procedimiento similar fue llevado a cabo con la construcción pDest-Cherry-EGFP-LC3 para estudiar el estado del flujo autofágico en la infección con BEV.

3.7.5 Cuantificación del grado de colocalización

Los estudios de colocalización se llevaron a cabo utilizando el *software* libre ImageJ/Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>). Para ello, se obtuvieron imágenes de inmunofluorescencia (n=5), cada una de ellas incluyendo aproximadamente 20 células, en un microscopio confocal Leica TSC SP5 tal y como se describe en el apartado Inmunofluorescencia (3.7.1 de materiales y métodos). Las imágenes fueron importadas y procesadas con el *software* ImageJ para separar cada serie de cortes (*z-stack*) en los diferentes canales o proteínas, y el grado de correlación entre canales fue determinado aplicando el programa de colocalización JACoP (Bolte y col., 2006) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>) sobre los cortes correspondientes. Los valores de colocalización se dan como índice de correlación de Pearson's y en el estudio se muestra como la media de los valores de las 5 imágenes analizadas.

3.7.6 Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de confocal

A partir de las imágenes de microscopía confocal se hizo una reconstrucción tridimensional del ensayo de microscopía confocal entre la M^{pro} y dsRNA. Para adquirir todo el volumen las



imágenes fueron capturadas con una distancia de pasada optimizada de 0,13 μm en el microscopio confocal Leica TSC SP5. El volumen 3D fue generado utilizando el *software* Imaris (Bitplane AG) aplicando un *threshold* automático.

3.8 Microscopía electrónica

La microscopía electrónica se llevó a cabo en colaboración con el servicio de microscopía del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, CSIC). Las muestras una vez fijadas fueron llevadas al servicio de microscopía y su personal se encargó del procesamiento de las mismas hasta la generación de las rejillas a examinar.

3.8.1 Inclusión convencional en resina epoxi TAAB-812

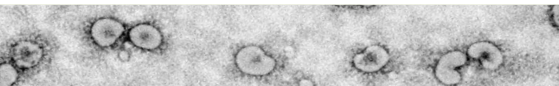
Para estos ensayos utilizamos monocapas de células E.Derm o MRC5 ($\sim 10 \times 10^6$ células/placa) infectadas con BEV que fueron fijadas *in situ* durante 2 h a temperatura ambiente con una mezcla de glutaraldehído al 2 % y PFA al 4 % en tampón fosfato Sörensen 0,1 M pH 7,4 en agua bidestilada, seguido de una incubación a 4°C durante toda la noche en PFA al 4 % en el mismo tampón. Después de varios lavados con tampón fosfato Sörensen, las células fueron raspadas, centrifugadas y los pellets fueron procesados para su inclusión en resina epoxi TAAB-812 (TAAB laboratories, Berkshire, Reino Unido) siguiendo protocolos estándar. Brevemente, las células fueron tratadas con una mezcla de tetróxido de osmio al 1 % y ferrocianuro de potasio al 0,8 % en agua bidestilada durante 1 h a 4°C. Después de 3 lavados en agua bidestilada, la muestra fue incubada durante un minuto en ácido tánico al 0,15 % en tampón fosfato Sörensen, lavada de nuevo y seguidamente fue teñida “en bloque” con acetato de uranilo al 2 % durante 1 h en oscuridad. Tras 3 lavados con agua bidestilada, el pellet de células fue deshidratado con concentraciones crecientes de etanol (50 %, 70 %, 90 %, 95 % y 3 veces al 100 %) durante 5-10 min a 4°C cada vez. Seguidamente, la infiltración de la resina fue

realizada a temperatura ambiente en agitación con diferentes concentraciones de etanol-Epon (3:1, 1:1, 1:3, y 100% de resina), con cambio de concentración cada hora y manteniéndose en resina al 100 % durante toda la noche. Por último, la resina infiltrada fue polimerizada a 60°C durante 48 h.

Los bloques resultantes fueron tallados para obtener un frente de corte de pequeño tamaño y de forma trapezoidal. A partir de ellos se obtuvieron secciones ultrafinas de aproximadamente 70 nm utilizando un micrótopo ULTRACUT E (Leica), las cuales fueron teñidas durante 7 min con acetato de uranilo al 2 % en agua y 3 min con citrato de plomo de Reynolds. Los cortes fueron recogidos sobre rejillas de cobre con una malla de 200 y examinados en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (Jeol) que opera a 80 kV. Las imágenes fueron capturadas mediante una cámara digital 4Kx4K TemCam-F416 (TVIPS).

3.8.2 Inclusión de monocapas celulares en resina epoxi TAAB-812

Las monocapas de células E.Derm crecidas sobre placas de cultivo de 60 mm ($\sim 4 \times 10^5$ células/placa) fueron fijadas tal y como se indica en el apartado anterior y procesadas directamente sobre la placa de cultivos. Para ello, después de varios lavados con tampón Sörensen las monocapas de células fueron tratadas con tetróxido de osmio al 1 % y ferrocianuro de potasio al 0,8 % durante 1 h a 4°C, teñidas con acetato de uranilo al 2 % durante 1 h, y deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol durante 5 min a 4°C siguiendo los pasos descritos anteriormente, para posteriormente ser embebidas en una fina película de resina TAAB-812. Una vez polimerizada la resina, se eliminó el plástico de la placa de cultivo, se troceó la monocapa de células embebida en la resina y los fragmentos se colocaron sobre bloques cilíndricos de resina preformados, orientados de forma adecuada para obtener cortes seriados empezando desde la parte basal de las células. Se obtuvieron secciones ultrafinas de 70 nm que fueron tratadas



tal como se describe en el apartado anterior.

Para los ensayos de microscopía electrónica con el BToV Aichi/2004, se utilizaron monocapas de células HRT-18 crecidas sobre placas de 60 mm ($\sim 4 \times 10^6$ células/placa) infectadas con 500 μ l de sobrenadante de Aichi/2004 (pase 7). A los tiempos indicados las monocapas de células fueron embebidas en resina TAAB-812 siguiendo los pasos descritos en el párrafo anterior.

3.8.2.1 Cortes seriados

Se obtuvieron cortes seriados ultrafinos de aproximadamente 50 nm de grosor a partir de monocapas de células E.Derm incluidas en resina EML-812 tal y como se indica en el apartado anterior. Los cortes seriados fueron depositados de manera consecutiva sobre rejillas de ojal recubiertas con una fina película de Formvar, y teñidos durante 7 min con acetato de uranilo al 2 % y 3 min con citrato de plomo de Reynolds.

Para generar el volumen, se localizó una zona de interés y se capturaron imágenes de esa región en cada uno de los cortes consecutivos utilizando una cámara digital 4Kx4K TemCam-F416 (TVIPS). La serie de imágenes se alineó de forma manual utilizando el programa Reconstruct (Fiala, 2005) (<http://synapses.clm.utexas.edu/tools/reconstruct/reconstruct.stm>). Una vez alineadas se segmentaron las regiones de mayor interés utilizando el programa de modelado de uso libre IMOD (Kremer y col., 1996) (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>). Para facilitar la segmentación, las imágenes fueron filtradas con el programa ImageJ utilizando un filtro Gaussian Blur con dos puntos de radio.

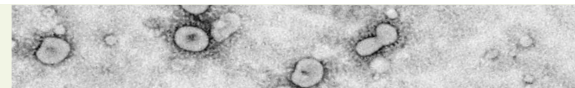
3.8.3 Criosustitución

Las monocapas de células E.Derm ($\sim 10 \times 10^6$ células/placa) infectadas con BEV fueron fijadas *in situ* con 4 % de PFA y 0,1 % de glutaraldehído en tampón fosfato Sörensen 0.1 M (pH 7,4) durante 2h a temperatura ambiente, y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche en la misma solución sin glutaraldehído. Después de varios lavados con tampón fosfato Sörensen, las células fueron

raspadas, centrifugadas e incluidas en gelatina al 10 % en PBS. Seguidamente, las células fueron crioprotegidas a 4°C mediante el tratamiento con glicerol al 15 % diluido en PBS durante 30 min, seguido de otros 30 min con glicerol al 30 %. A continuación las células fueron sometidas a congelación ultrarápida en propano líquido utilizando un equipo de criofijación por inmersión KF80 (Leica). La criosustitución se realizó a -85°C en metanol anhidro con 0,5 % de acetato de uranilo en un sistema de criosustitución automático (AFS, Leica) durante 54 h con 4 cambios de medio de sustitución. Posteriormente, la temperatura fue aumentando gradualmente hasta los -45°C, en un proceso controlado por la unidad de criosustitución (5°C/h), y posteriormente mantenida constante durante 24 h. Las muestras fueron lavadas con metanol puro 3 veces durante 1 h a -45°C e infiltradas en lowicryl HM20 (Laboratorios EML) durante 24 h, sustituyendo el medio de criosustitución por concentraciones crecientes de resina en metanol (60 min a una concentración 2:1 metanol:HM20, 120 min 1:1, 60 min 2:1, 60 min en HM20 pura, dando un nuevo cambio de resina pura y manteniéndola toda la noche). El proceso de polimerización se realizó con luz ultravioleta aumentando gradualmente la temperatura hasta los 22°C (38 h a -45°C, rampa de 10°C/h hasta 0°C, permaneciendo 1 h a 0°C, una segunda rampa 11°C/h hasta 22°C, y 24 h a 22°C). A partir de los bloques preparados se obtuvieron secciones ultrafinas de 70 nm utilizando el ultramicrotomo ULTRACUT E (Leica), que fueron recogidas sobre rejillas hexagonales de cobre/paladio con una malla de 100.

3.8.4 Crio secciones

Las monocapas de células E.Derm ($\sim 10 \times 10^6$ células/placa) infectadas con BEV fueron fijadas *in situ* con 4 % de PFA y 1 % de glutaraldehído en tampón PHEM pH 6,9 (240 mM Pipes, 100 mM Hepes, 8 mM $MgCl_2$ y 40 mM EGTA) durante 2 h a temperatura ambiente y seguidamente fueron mantenidas a 4°C en una solución con 4 % de PFA



sin glutaraldehído durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS con 20 mM de glicina, raspadas, centrifugadas y los pellets fueron incluidos en gelatina al 12 % en PBS. Los bloques resultantes fueron tallados en cubos de 0,5 mm³, que fueron crioprotegidos mediante el tratamiento con una solución de sacarosa en PBS 2,3 M durante toda la noche con agitación. Seguidamente, los bloques fueron montados sobre portamuestras del crioultramicrotomo y sometidos a ultracongelación rápida en nitrógeno líquido, donde permanecen sumergidos para su conservación y mantenimiento. Las secciones ultrafinas (60-80 nm) fueron obtenidas a -120°C utilizando un ultramicrotomo ULTRACUT UCT con criocámara EM FCS (Leica). Los criocortes fueron recogidos con un loop en una solución consistente en una mezcla (1:1) de sacarosa 2,3 M y 2% de metilcelulosa en agua, y fueron depositados sobre rejillas cobre/paladio con una malla de 100, que previamente habían sido recubiertas por una fina película de formvar y sombreadas con carbón. Las rejillas se conservaron a 4°C sobre una gota de la solución de metilcelulosa:sacarosa en placas de Petri hasta la realización del inmunomarcado.

Para observar las muestras directamente al microscopio electrónico de transmisión las rejillas fueron teñidas e incluidas en una solución de acetato de uranilo al 4 % y metilcelulosa al 2 % sobre hielo antes de ser examinadas.

3.8.4.1 Inmunomarcado con oro coloidal en criosecciones

Para llevar a cabo el inmunomarcaje de criosecciones con diferentes anticuerpos se siguió básicamente el procedimiento descrito en el apartado anterior con ligeras modificaciones en la fijación para preservar la reactividad de las proteínas con los anticuerpos. En este caso las monocapas de células E.Derm (~10x10⁶ células/placa) infectadas con BEV fueron fijadas *in situ* con 4 % de PFA y 0.1 % de glutaraldehído en tampón PHEM pH 6,9. Para que la fijación fuera más suave

se añadió fijador 2x directamente sobre el medio de cultivo (1:1) y se mantuvo durante 30 min y luego se cambió a fijador 1x hasta completar las 2 h de fijación. Por último las células se mantuvieron durante toda la noche con 8 % de PFA en tampón PHEM. Debido a que los anticuerpos anti-M^{pro} y anti-RdRp mostraron sensibilidad a la fijación con glutaraldehído, los ensayos con estos sueros se realizaron sobre células fijadas únicamente con PFA.

Para el inmunomarcado se utilizaron rejillas con criocortes conservados en la solución de metilcelulosa:sacarosa tal como se describe en el apartado anterior. Primeramente se retiró la solución de metilcelulosa:sacarosa tras colocar las rejillas con las secciones hacia abajo sobre gelatina al 2 % en PBS durante 20 min a 37°C. Seguidamente, se procedió al inmunomarcado pasando las rejillas con los cortes hacia abajo por sucesivas gotas colocadas sobre un parafilm®. En concreto, las secciones fueron incubadas 4 veces durante 2 min en PBS con 0,15 % de glicina antes de ser bloqueadas en PBS con 10 % de FCS durante 10 min. Seguidamente fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo con 5 % de FCS, lavadas 3 veces en PBS con FCS al 0,2 % e incubadas durante otra hora con proteína A acoplada a oro coloidal de 10 nm en solución de bloqueo. En el caso del inmunomarcado con anti-dsRNA, al tratarse de un anticuerpo generado en ratón, se incubó con un anticuerpo puente de conejo anti-IgG de ratón antes de incubar con proteína A acoplada a oro coloidal. Finalmente las secciones fueron tratadas con 1 % glutaraldehído en PBS durante 5 min, lavadas con agua bidestilada y teñidas con una solución de acetato de uranilo al 4 % y metilcelulosa al 2 % durante 10 min. Las rejillas se dejaron secar durante al menos una hora antes de ser examinadas al microscopio electrónico de transmisión.

3.8.5 Tomografía y reconstrucción tridimensional

Se obtuvieron secciones de aproximadamente 300 nm de grosor a partir de monocapas de células E.Derm incluidas en resina TAAB-812 tal y como se indica en el apartado 3.8.2 de materiales y métodos. Las secciones se depositaron sobre rejillas Quantifoil holey® Carbon films (Quantifoil S 7/2 de cobre con malla de 200; Quantifoil Micro Tools) y sin teñir fueron preparadas para su análisis por tomografía, el cual se realizó en colaboración con el grupo de Dr. J.L.Carrascosa (Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC). Antes de realizar la tomografía, sobre los cortes se depositó una pequeña capa de partículas de oro para facilitar el alineamiento posterior de las imágenes, y además las rejillas fueron sometidas a una baja dosis de iones durante varias horas para estabilizar la muestra. La serie tomográfica se adquirió con un microscopio FEI Tecnai G2 F20 que opera a 200 kV, utilizando una cámara CCD FEI Eagle 4 k y el programa FEI Xplore3D. Las imágenes fueron adquiridas cada grado desde los -65°C hasta los 65°C con una desviación del foco aproximada de 5µm.

Finalmente la series tomográficas fueron alineadas usando el software IMOD y segmentadas usando el programa Amira (FEI) gracias a la colaboración del Dr. J.J.Fernandez (Departamento de Estructura de Macromoléculas del CNB, CSIC).

3.9 Generación de células estables que expresan la proteína de fusión GFP-LC3

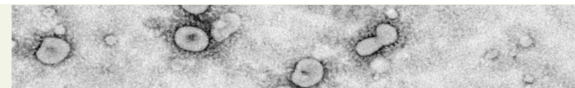
Para ello se utilizaron células E.Derm recién descongeladas y crecidas sobre placas de cultivo de 100 mm a una confluencia del 70 % que fueron transfectadas con 30 µg del vector pGFP-LC3B y 30 µl de Lipofectamina 2000 siguiendo los pasos descritos anteriormente (apartado 3.5 de material y métodos). A las 48h post-transfección las células fueron despegadas de las placas de cultivo con tripsina (apartado 1.1 de material y métodos) y diluidas 1/10 para generar clones aislados. Se

sembraron 10 placas de cultivo de 100 mm en medio DMEM con 15 % de FCS al que se añadió 500 µg/ml de G418 (Sigma-Aldrich) para seleccionar aquellas células que han incorporado el plásmido. Se cambió el medio cada 4 o 5 días, y a los 12 días se examinaron las células en un microscopio de fluorescencia y se seleccionaron los clones que expresaban GFP. Para el aislamiento de estos clones se utilizaron cilindros de clonación de 150 µl (Sigma). Para ello, las células se lavaron con PBS, se colocó el cilindro alrededor del clon, se retiró el PBS de su interior y se añadió tripsina (50 µl). Una vez levantadas las células se diluyeron en DMEM con 15 % de FCS y se sembraron sobre placas de 35 mm. Una vez crecidas las células fueron congeladas para su conservación en nitrógeno líquido (ver apartado 1 de materiales y métodos).

Los diferentes clones se analizaron por fluorescencia e inmunoblot, seleccionando el clon 4.1 para realizar los distintos ensayos, ya que fue el que presentó una mayor señal de GFP y una morfología adecuada.

3.9.1 Cuantificación de autofagosomas

El número de puntos de GFP o autofagosomas formados en las células que expresan la proteína GFP-LC3, infectadas o sometidas a diferentes tratamientos, se contabilizó utilizando imágenes adquiridas en el microscopio confocal (ver apartado 3.7 de materiales y métodos). Para ello, utilizando el programa ImageJ/fiji se seleccionó el contorno de la célula a analizar con la herramienta ROI *manager* y se cuantificó el número de puntos de GFP en esta célula utilizando la herramienta *analyze particles* aplicando un umbral automático (*threshold* Intermodos), y considerando únicamente los puntos con más de 2 píxeles de tamaño como verdaderos puntos. Los datos se representaron como porcentaje de células con puntos de GFP, considerándose células positivas aquellas que presentan más de 10 puntos GFP en su citoplasma (n=20).



3.10 Silenciamiento génico: RNA de interferencia

3.10.1 Silenciamiento utilizando vectores retrovirales

3.10.1.1 Generación de pseudopartículas retrovirales para el silenciamiento de Beclin 1

La generación de pseudopartículas retrovirales se llevó a cabo mediante la transfección de células HEK293T con los vectores que portan el shRNA correspondiente y el vector de empaquetamiento retroviral, utilizando lipofectamina 2000. En concreto, se utilizaron 4 µg de pSuperBeclin-1KD o pSuperControl, junto con 4 µg de pC-Ampho en 600 µl de Opti-MEM y 16 µl de lipofectamina 2000 (Life Technologies) diluida en 600 µl de Opti-MEM. Tras una incubación de 5 min, se añadió la mezcla de lipofectamina gota a gota sobre el medio con DNA, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Por otra parte, durante el transcurso de esta incubación, las células HEK293T fueron despegadas de las placas de cultivo con tripsina y sembradas en una placa de 100 mm (~5x10⁶ células/placa) en medio DMEM sin antibióticos y con 10 % de FCS. Tras la incubación, se añadió la mezcla de lipofectamina/DNA sobre las células recién sembradas, y al día siguiente se les cambió el medio de cultivo por medio con FCS al 10 %. A las 24 h se recolectó el sobrenadante con las pseudopartículas, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se guardó a -80°C. Mediante este procedimiento se obtuvieron dos tipos de pseudopartículas, que denominamos Beclin1-KD y control.

3.10.1.2 Obtención de células equinas silenciadas de forma estable para Beclin 1 utilizando pseudopartículas retrovirales

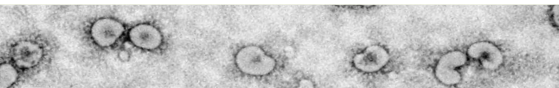
Para obtener células silenciadas para Beclin 1 partimos de células E.Derm recién descongeladas y crecidas sobre placas de 60 mm entorno al 50 % de confluencia. Las células fueron transducidas con 3 ml de sobrenadante con pseudopartículas virales Beclin1-KD o Control al cual se le añadió 8 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich) para favorecer la eficiencia de transducción. Después de 8-10 h se repitió la

transducción retirando el medio y añadiendo 3 ml del sobrenadante correspondiente con 4 µg/ml de polibreno. Transcurridas 24 h se volvió a repetir la transducción añadiendo 3 ml de sobrenadante con 4 µg/ml de polibreno, y a las 32 h se cambió el medio por DMEM con FCS al 15 %. A las 48 h se inició la selección mediante la adición de 2 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo. Pasados 3-4 días, una vez que las células están seleccionadas y creciendo en forma de monocapas, fueron despegadas de las placas con tripsina y crecidas en medio de cultivo con 0,5 µg/ml de puromicina para mantener la selección. Estas células fueron conservadas en nitrógeno líquido tal y como se indica en el apartado 1 de materiales y métodos.

3.10.2 Silenciamiento utilizando vectores lentivirales

3.10.2.1 Generación de pseudopartículas lentivirales

La generación de pseudopartículas lentivirales se llevó a cabo mediante la transfección de las células HEK293T con el vector que porta el shRNA correspondiente y los vectores necesarios para su empaquetamiento, utilizando como agente de transfección fosfato cálcico. Para ello, 10 µg de pMDLg/pRRE, 3,6 µg de pRSV-Rev, 5 µg de pM2.G y 10 µg del pKLO.1-shRNA correspondiente (ver apartado 2.1 de materiales y métodos) fueron diluidos en 375 µl de agua, y sobre esta dilución se añadió gota a gota 55 µl de CaCl₂ 2 M. A continuación la mezcla fue añadida gota a gota sobre 450 µl del tampón 2xHBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 12 mM D-Glucose, 50 mM HEPES pH 7,05) y fue incubada durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió la mezcla directamente sobre el medio de cultivo de las células (~2x10⁶ células/placa) sembradas el día anterior en placas de 100 mm, y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se reemplazó el medio de transfección por medio de cultivo nuevo y se mantuvieron las células durante otras 24 h produciendo partículas lentivirales. Finalmente, los sobrenadantes fueron recolectados, filtrados a través de filtros de 0,45 µm, y guardados a -80°C en alícuotas para su posterior uso.



3.10.2.2 Titulación de pseudopartículas lentivirales

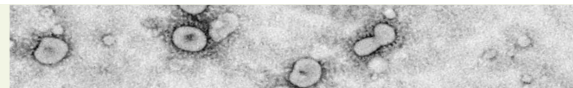
Los pseudopartículas lentivirales no pueden ser tituladas de manera tradicional dado que carecen de capacidad replicativa, al tratarse de meros vehículos utilizados para introducir DNA exógeno dentro de la célula. Por esta razón, se hicieron titulaciones funcionales en las que se buscó el volumen mínimo necesario para transducir toda la monocapa de células. Para ello, se utilizaron volúmenes de 200, 150, 100, 50 y 25 μl de lentivirus para transducir células E.Derm ($\sim 1 \times 10^6$ células/pocillo) sembradas sobre placas de 24 pocillos. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio completo con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina. Para cada lentivirus se determinó como volumen adecuado aquel volumen mínimo de lentivirus con el que se mantiene intacta la monocapa de células al tercer día de selección con puromicina. Como control se añadió puromicina a células sin transducir.

3.10.2.3 Obtención de células equinas silenciadas de forma estable para Beclin 1 y Atg4B utilizando pseudopartículas lentivirales

Para obtener células silenciadas de forma estable para Beclin 1 y Atg4B con pseudopartículas lentivirales partimos de células E.Derm recién descongeladas y crecidas en placas de 12 pocillos con una confluencia de entorno al 70 %. Las células fueron transducidas con 100 μl de los lentivirus que portan el plásmido para expresar los shRNA de Beclin 1 o de Atg4B, o el shRNA control (ver tabla I). En el caso de Atg4B se emplearon 2 shRNA nombrados como Atg4B 800 y Atg4B 801 (ver tabla I) que fueron utilizados por separado. Para ello, se añadió cada lentivirus directamente sobre el medio de cultivo y se incubaron las células toda la noche. Al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se añadió medio de cultivo con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina. Pasados 3-4 días, una vez que las células están seleccionadas y creciendo en forma de monocapas, fueron despegadas de las placas con tripsina y crecidas en medio de cultivo con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina para mantener la selección, y utilizadas en los ensayos o congeladas y mantenidas en nitrógeno líquido hasta su posterior uso.

3.10.2.4 Silenciamiento de LC3B en células equinas utilizando partículas lentivirales

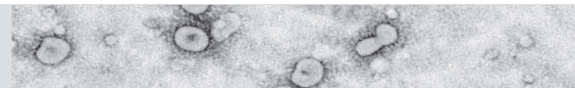
Para el silenciamiento de LC3 se emplearon varios shRNA nombrados del 0 al 5 (ver tabla I). En este caso las células E.Derm crecidas sobre placas de 6 pocillos a una confluencia del 70 % fueron transducidas con 600 μl por pocillo del correspondiente lentivirus. Las células fueron seleccionadas con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromicina siguiendo los pasos indicados en el apartado anterior, pero en este caso las células no se congelaron para su posterior uso. En los ensayos de silenciamiento de Beclin 1 se observó que estas células tendían a revertir el silenciamiento con los pases, por esta razón, en el caso de LC3 los ensayos se realizaron en la ventana de tiempo comprendida entre los 5 y 12 días post-transducción con el lentivirus. Pasados los 12 días post-transducción, las células se descartaron y se volvieron a transducir nuevas células E.Derm para futuros ensayos. Como control en paralelo se trataron células con el lentivirus shRNA control.



O4

RESULTADOS





I. Complejos de replicación y transcripción de los torovirus: localización intracelular y origen de las membranas implicadas

1. Obtención de sueros específicos frente a las proteínas no estructurales (nsps) de BEV

1.1 Producción

Para producir el suero de la RdRp se expresó en bacterias un fragmento de 253 aminoácidos que corresponde a la posible región N-terminal de la polimerasa de BEV. La elección de este fragmento se llevó a cabo teniendo en cuenta el modelo de

procesamiento de las poliproteínas pp1a/pp1ab de BEV propuesto por Smits y colaboradores (Smits y col., 2006). Aunque el modelo no presenta una región de corte entre el dominio CPD y la polimerasa (ver esquema 1), tal y como ocurre en todas las polimerasas de los coronavirus estudiados hasta la fecha, es probable que exista un sitio de corte no canónico posterior al *frameshift* que permita que ambos dominios RdRp y CPD se expresen de forma independiente. Además, estas polimerasas presentan dos dominios diferenciados, un dominio C-terminal de aproximadamente 500 aminoácidos donde se localiza el dominio catalítico polimerasa, y un dominio N-terminal de unos 300 aminoácidos de función desconocida (Xu y col., 2003), que recientemente ha sido descrito como un dominio inmunogénico (Nogales y col., 2011). El análisis de secuencia de la polimerasa de BEV muestra un dominio conservado RdRp en su extremo C-terminal y una región N-terminal

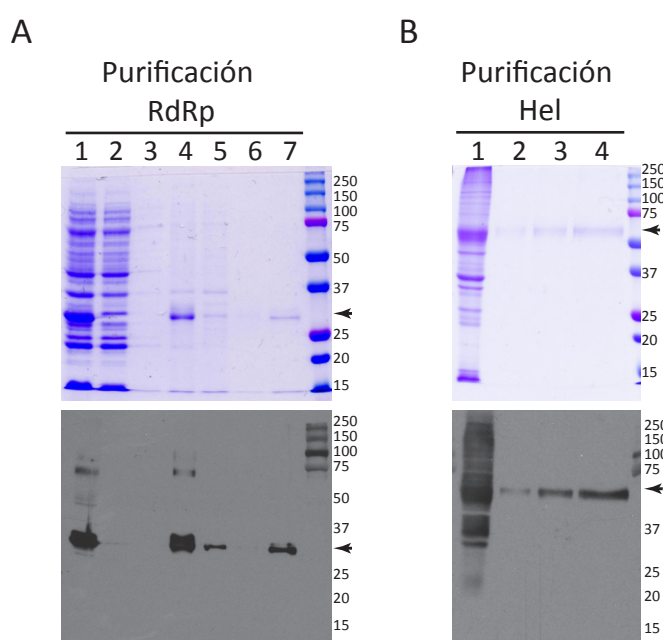


Figura 1. Purificación de las proteínas recombinantes RdRp-Nt y Hel de BEV.

Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (paneles superiores) o inmunoblot con un anticuerpo anti-histidinas (paneles inferiores) de los distintos pasos de purificación de cada proteína. **A)** RdRp-Nt: Lisado bacteriano (carril 1), sobrenadante tras la centrifugación del lisado (carril 2), lavado del pellet (cuerpos de inclusión) con tampón A 1 M de Urea (carril 3), pellet resuspendido en tampón A 8 M de urea (carril 4), proteínas remanentes del lisado tras su paso por la columna de afinidad (carril 5), lavado de la columna con tampón A 5 mM imidazol (carril 6), elución con tampón A 150 mM imidazol. **B)** Hel: Cuerpos de inclusión lavados con tampón A con 1 mM de Urea (carril 1), concentraciones crecientes de la proteína electroeluida (carriles 2-4). A la derecha se muestra la posición y tamaño de los marcadores de peso molecular en kDa.

con homología con el dominio N-terminal de la polimerasa de los coronavirus. Teniendo en cuenta estas consideraciones se expresó un fragmento correspondiente a los 253 aminoácidos posteriores al *frameshift* que abarca la región con homología al dominio inmunogénico de coronavirus, al que se denominó RdRp-Nt. El fragmento fue expresado en bacterias fusionado en su extremo N-terminal a un *tag* de histidinas para su posterior purificación. Como muestra la figura 1A, en los lisados de bacterias se observa una proteína del tamaño esperado de 33 kDa, que fue detectada mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-histidinas. La RdRp-Nt se expresó mayoritariamente en forma de cuerpos de inclusión altamente insolubles. Aprovechando esta insolubilidad se enriqueció la proteína mediante lavados de los cuerpos de inclusión con tampón A (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl) con 1 M de urea que permite la eliminación de gran parte de las proteínas celulares, y la fracción insoluble resultante se solubilizó utilizando el mismo tampón con 8 M de urea. La RdRp-Nt se purificó mediante cromatografía de afinidad por unión al cobalto inmovilizado en una resina comercial (Fig. 1A). Una vez eluida la proteína fue dializada para eliminar los restos de urea e imidazol y fue utilizada para la producción de un suero específico anti-RdRp.

En el caso de la Hel, teniendo en cuenta el modelo de procesamiento de las poliproteínas pp1a/pp1ab de BEV propuesto por Smits y colaboradores (Smits y col., 2006), se expresó la posible proteína madura fusionada a un *tag* de histidinas (tamaño esperado de 67 kDa). Al igual que la RdRp-Nt, la Hel fue altamente insoluble, siendo expresada mayoritariamente en forma de cuerpos de inclusión. Siguiendo el protocolo utilizado anteriormente, la proteína fue enriquecida en tampón A con 1 M de urea, solubilizada con tampón A con 8 M de urea, y purificada por afinidad a cobalto. Sin embargo, en este caso el rendimiento fue muy bajo ya que entorno a un 50 % de la proteína no se solubiliza bajo estas condiciones, y la parte soluble presentó

una baja unión a la resina. No obstante, como se muestra en la figura 1B, los cuerpos de inclusión una vez lavados con tampón A con 1 M de urea quedan formados casi en exclusiva por la proteína recombinante, como demuestra el que la mayoría de las proteínas observadas por tinción con azul de Coomassie sean detectadas con el anticuerpo anti-histidinas. Ante la imposibilidad de purificar la proteína por cromatografía, y dado el gran grado de pureza de los cuerpos de inclusión, se decidió separar electroforéticamente las proteínas de los cuerpos de inclusión para posteriormente escindir del gel la banda mayoritaria de 67 kDa correspondiente a la helicasa. Finalmente, la proteína fue electroeluida del gel, dializada y concentrada para ser utilizada en la obtención de un suero anti-Hel.

A diferencia de los dos sueros anteriores, los sueros frente a la M^{pro} se obtuvieron mediante la inmunización de conejos o ratas con un péptido sintético correspondiente al extremo C-terminal de la proteína, tal y como se indica en materiales y métodos.

1.2 Caracterización

Inicialmente los sueros fueron caracterizados por inmunofluorescencia tal y como muestra la figura 2A-D. Para ello, se utilizaron cultivos de células E.Derm infectadas o no infectadas con BEV y fijadas a las 16 hpi. Todos los sueros mostraron una señal específica en forma de parches entorno al núcleo de las células infectadas, la cual no fue visible en las células sin infectar. Aunque con los sueros anti-Hel y anti-RdRp la señal específica es clara, existe un gran fondo inespecífico muy visible en las células sin infectar. Para mejorar la especificidad de estos dos sueros, ambos se sometieron a purificación por afinidad al antígeno (PA), obteniendo una considerable reducción del fondo inespecífico tal y como se muestra en la figura 2C-D.

Además los sueros se caracterizaron por inmunoblot utilizando extractos de células E.Derm infectadas o no infectadas con BEV durante 16 hpi.

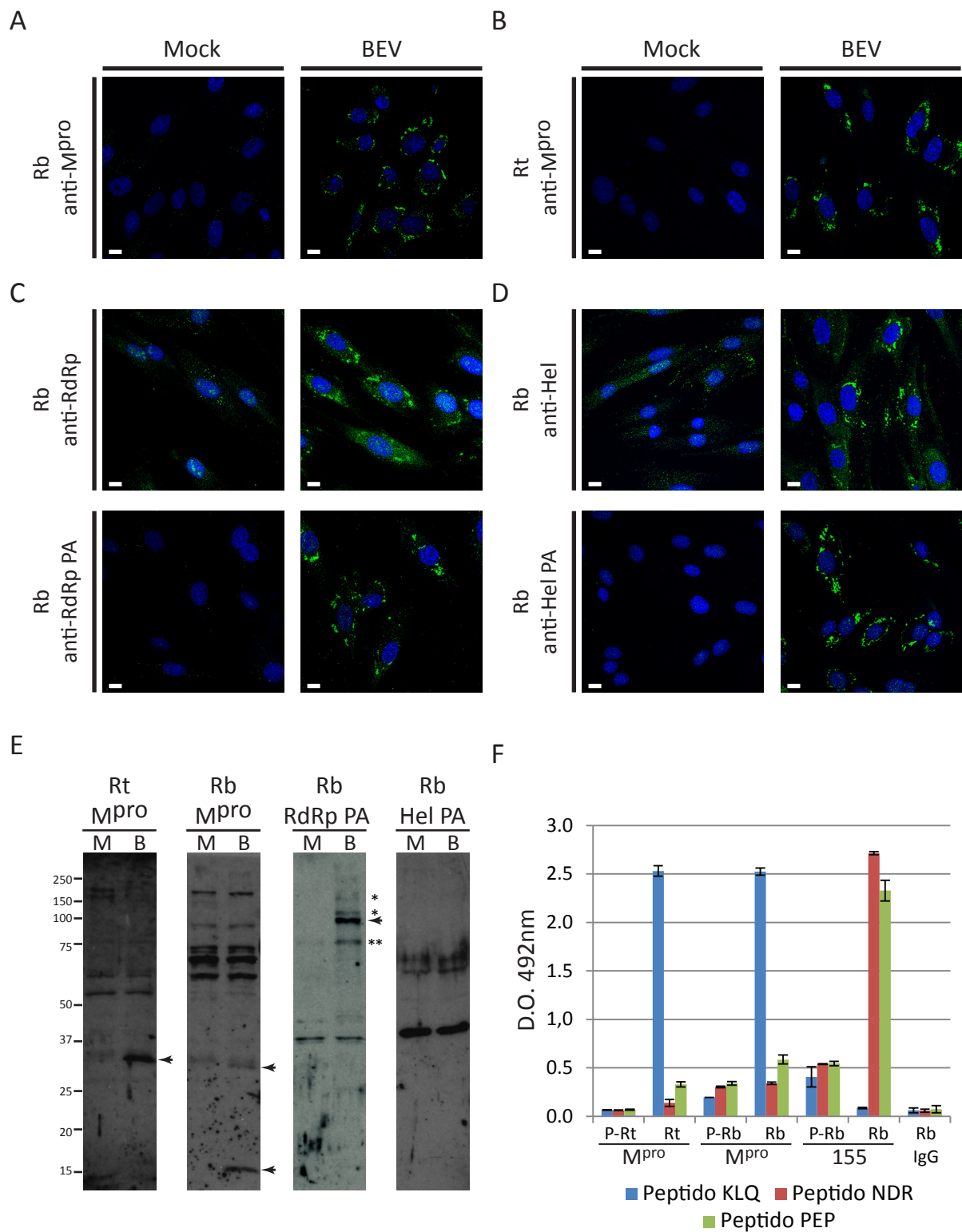
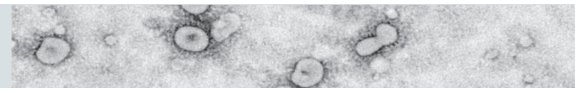


Figura 2. Caracterización de los sueros obtenidos frente a las nsps M^{pro}, RdRp-Nt y Hel de BEV.

A-D) Análisis por inmunofluorescencia de células E.Derm infectadas con BEV o no infectadas (mock) y fijadas a las 16 hpi con PFA al 4 %. Las células se incubaron con DAPI para teñir los núcleos y con los sueros: **A)** Rb anti-M^{pro}; **B)** Rt anti-M^{pro}; **C)** Rb anti-RdRp (paneles superiores) o el suero purificado por afinidad al antígeno Rb anti-RdRp PA (paneles inferiores); **D)** Rb anti-Hel (paneles superiores) o el suero purificado por afinidad al antígeno, Rb anti-Hel PA (paneles inferiores); **E)** Análisis por inmunoblot de extractos de células E.Derm infectadas con BEV (B) o no infectadas (M), recogidas a 16 hpi, utilizando los sueros anteriores. A la izquierda se muestra la posición y tamaño de los marcadores de peso molecular. El asterisco indica especies intermedias del procesamiento de las poliproteínas, y los dos asteriscos señalan a una proteína probablemente reconocida de forma inespecífica, presente en células sin infectar, y en mayor abundancia en células infectadas. **F)** Análisis mediante ELISA de la reactividad de los sueros de la M^{pro} frente al péptido sintético utilizado para su generación (KLQ). Como controles se incluyeron 2 péptidos sintéticos de la región de la Hel (NDR y PEP), así como los sueros preinmunes (P-Rt-M^{pro}, P-Rb-M^{pro}), y un suero generado tras la inmunización con los péptidos de la Hel (Rb anti-155). También se incluyó el anticuerpo secundario utilizado en el ensayo (Rb IgG).

Como se muestra en la figura 2E, el anticuerpo anti-M^{pro} generado en rata reconoce específicamente una proteína de 33 kDa en los extractos de células infectadas con BEV, que corresponde a la M^{pro} de BEV previamente descrita por Smits y colaboradores (Smits y col., 2006). Curiosamente el anticuerpo generado en conejo reconoce la proteína de 33 kDa pero presenta mayor reactividad con una proteína de 16 kDa. Smits y colaboradores describieron un procesamiento interno de la M^{pro} de BEV al expresar heterológicamente la proteína en bacterias, cuyo resultado es la obtención de dos fragmentos de 16 kDa. Sin embargo ellos no observaron evidencias de que este procesamiento ocurriera en células de mamífero infectadas con BEV. El análisis mediante ELISA (Fig. 2F) muestra que ambos sueros presentan una reactividad similar frente al péptido KPL utilizado para inmunizar los animales, y no muestran reactividad frente a dos péptidos control de la Hel (NDR y PEP), que como era de esperar, fueron reconocidos por un suero de conejo anti-Hel generado mediante la inmunización con dichos péptidos. Este resultado indica que realmente ambos sueros frente a la M^{pro} reconocen específicamente esta proteína de BEV, aunque de manera diferencial.

En el caso de la RdRp (Fig. 2E), utilizando el suero anti-RdRp PA, se observan varias bandas específicas, una mayoritaria entorno a 100 kDa y otras ligeramente superiores. La RdRp de BEV con el dominio CPD tiene un tamaño estimado de 115 kDa, mientras que el dominio RdRp por si solo estaría entorno a 100 kDa. Parece razonable pensar que la banda mayoritaria corresponde con la RdRp liberada a través del corte proteolítico en un sitio no canónico posterior al *frameshift*, mientras que la banda ligeramente superior corresponde al intermediario CPD-RdRp. El resto de bandas de mayor tamaño pueden corresponder a intermediarios del proceso de maduración de la replicasa de BEV. Aunque se observa también una banda a 75 kDa, esta termina apareciendo en el control de células no infectadas con tiempos de exposición mayores. No obstante, aunque

asumimos que es una proteína inespecífica que se enriquece con la infección, no podemos descartar la posibilidad de que sea un intermediario o un fragmento de degradación de la RdRp.

Por su parte, el anticuerpo anti-Hel PA no mostró reactividad específica en los ensayos de inmunoblot. No se observó de forma clara la banda esperada de 63 kDa.

2. Formación de DMVs en las células infectadas con BEV

Un gran número de estudios realizados sobre diferentes virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva indican que para este heterogéneo grupo de virus, invariablemente, la replicación y la transcripción ocurren en asociación con membranas celulares de diverso origen. Sin embargo, no se conoce nada a cerca de la reorganización membranosa que ocurre en las células infectadas por los miembros del género *Torovirus*. Por esa razón, quisimos examinar por microscopía electrónica de transmisión células E.Derm infectadas con BEV o no infectadas. Para ello, células infectadas durante 16 h o no infectadas fueron embebidas en resina TAAB-812 y se prepararon cortes ultrafinos para su análisis. Como se muestra en la figura 3, en el citoplasma de las células E.Derm infectadas con BEV observamos grupos de DMVs. Generalmente, las DMVs se localizaban cerca de la región perinuclear, rodeadas de mitocondrias y retículo endoplasmático (RE), y en ningún caso fueron observadas en las células no infectadas (resultados no mostrados). Una caracterización preliminar, de manera visual, muestra que las DMVs tienen un tamaño heterogéneo, con un diámetro entre 50-150 nm, aunque en algunas ocasiones se llegan a observar DMVs de más de 200 nm de diámetro. Además, mientras que algunas aparecen como vesículas vacías otras en cambio, a menudo las de menor tamaño, muestran un interior denso a los electrones. Aunque aparentemente las DMVs aparecen como estructuras aisladas unas de otras,

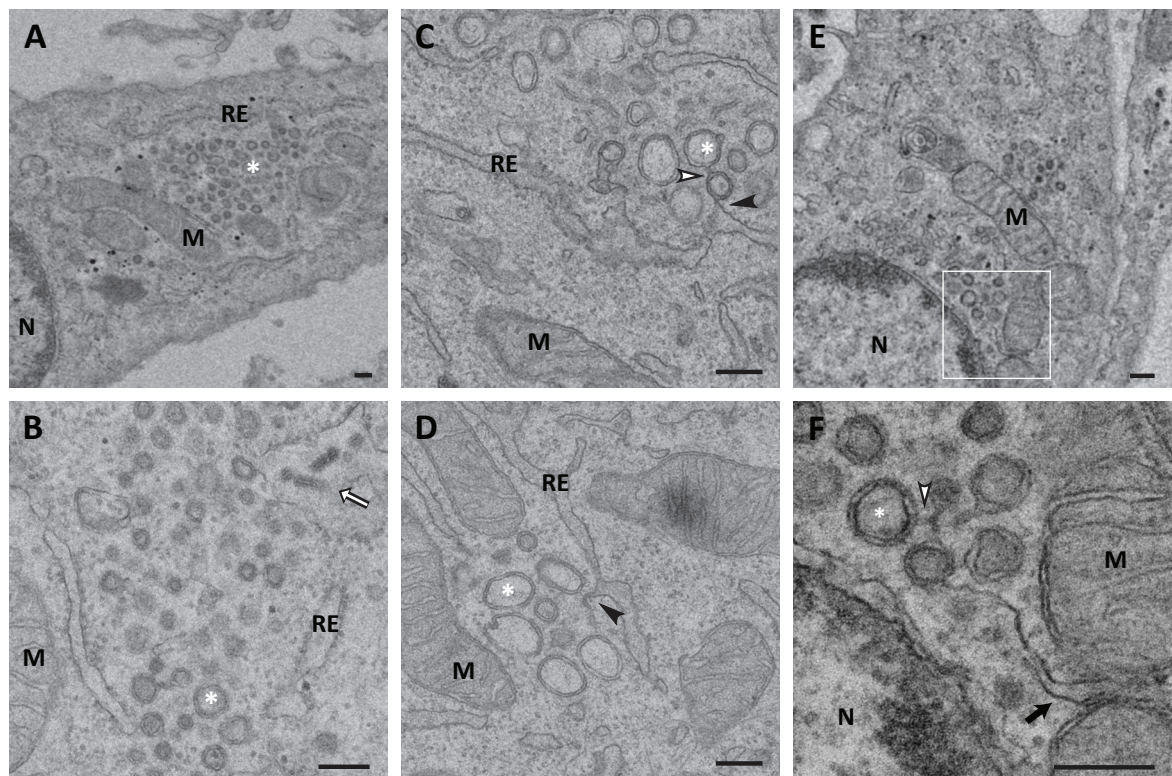


Figura 3. Análisis ultraestructural de células E.Derm infectadas con BEV.

Micrografías de células E.Derm infectadas con BEV a 16 hpi y embebidas en resina TAAB-812, en las que se observa la presencia de DMVs. **A)** Región de DMVs rodeada de mitocondrias y RE. **B)** Región de DMVs a mayor magnificación donde se pueden observar partículas virales de BEV. **C-D)** Las DMVs presentan conexiones entre ellas o con el RE. **E)** Conexiones entre las DMVs y el MAM. **F)** Región ampliada de E). M mitocondria; RE retículo endoplásmico; N núcleo; los asteriscos señalan DMVs; la flecha blanca señala partículas virales; el triángulo negro señala conexión RE-DMVs; el triángulo blanco señala conexión DMV-DMV; la flecha negra conexión MAM-DMV. Barra 200 nm.

una inspección más detallada revela la existencia de conexiones entre muchas de ellas (Fig. 3C). Además, también se observan conexiones entre las DMVs más periféricas y el RE (Fig. 3C-D), y aunque menos común, en ocasiones se observan conexiones entre las DMVs y las membranas del RE asociadas a mitocondrias (MAM) (Raturi y col., 2013) (Fig. E-F). El MAM se caracteriza por ser un dominio del RE con propiedades y composición lipídica diferentes a este, el cual está implicado en la estrecha comunicación entre el RE y la mitocondria, y aparece en las micrografías como túbulos del RE íntimamente relacionados con la membrana de la mitocondria, pero sin continuidad entre ambas.

Aunque se pueden observar viriones individuales en el área que ocupan las DMVs (Fig. 3B), en general a este tiempo la mayoría de

las partículas virales se acumulan en grandes vesículas segregadas del área de las DMVs. En ocasiones estas vesículas se observan fusionadas a la membrana plasmática liberando su contenido viral al medio extracelular.

Nuestro grupo había descrito previamente que BEV también puede crecer en la línea celular humana MRC5 (Maestre y col., 2011), aunque la infección lleva un cierto retraso con respecto a las células E.Derm. Por ello nos pareció interesante llevar a cabo un ensayo similar en esta línea celular. En este caso se examinaron células infectadas con BEV durante 24 h, en las que se distinguen nuevamente grupos de DMVs en la región perinuclear. Las DMVs que aparecen en las células MRC5 (Fig. 4) presentan características similares a las observadas en las células E.Derm, de tal forma que se ven conexiones entre ellas y con el

RE (Fig. 4B), así como alguna posible conexión con el MAM (Fig. 4C). Además, las partículas virales también fueron excluidas por regla general del área ocupada por las DMVs.

A continuación quisimos estudiar las DMVs inducidas por la infección con BEV en células procesadas para su observación bajo diferentes condiciones, con las que se consigue una mayor preservación de la estructura celular. Para ello, las células E.Derm infectadas (16 hpi) fueron sometidas a criofijación y criosustitución antes de ser embebidas en resina Lowicryl, o fueron procesadas directamente para obtener criosecciones, según se describe en la sección 3.8 de materiales y métodos. Diferentes estudios realizados en diferentes nidovirus (Knoops y col., 2012; Snijder y col., 2006) avalan la utilización de protocolos de criofijación y criosustitución para mejorar la preservación de las DMVs, sin embargo en nuestro caso las DMVs no fueron claramente visibles bajo estas condiciones. Como muestra la figura 5, se intuyen grupos de vesículas, que aparentemente son de doble membrana, localizadas en la región perinuclear de la célula infectada. En general, utilizando el protocolo de criofijación y criosustitución las membranas celulares fueron poco visibles, a este respecto, el RE rugoso se distingue gracias a los ribosomas que forman parte de él, pero apenas se pueden diferenciar las membranas que lo componen. De igual forma la mitocondria es fácilmente distinguible, pero apenas somos capaces de distinguir las crestas membranosas. A pesar de estos inconvenientes, esta técnica nos permite ver que el interior de las DMVs contiene un material muy electro denso, y también podemos distinguir las partículas virales.

Por el contrario, las criosecciones de células E.Derm infectadas con BEV (Fig. 5 C-D) muestran claramente grupos de DMVs que presentan las mismas características previamente observadas en las secciones en resina TAAB-812, es decir, aparecen localizadas generalmente cerca de la región perinuclear y rodeadas de

mitocondrias y RE. Aparentemente no se observan diferencias en el tamaño de las DMVs en función de la técnica, sin embargo su contenido interno se conservó mejor en las criosecciones, mostrando en general una apariencia más electrodensa. También se observaron algunas partículas en la vecindad de los grupos de DMVs, pero restringidas a áreas separadas.

Los resultados muestran que BEV induce una gran reorganización membranosa de las células que infecta basada en la formación de DMVs. Además, estos resultados avalan la hipótesis de la utilización por parte de los nidovirus de una plataforma común, basada en la formación de DMVs, donde llevan a cabo su replicación y transcripción. En este sentido, nosotros aportamos evidencias de la inducción de DMVs por parte de un miembro del género *Torovirus* en el que aún no se habían descrito.

3. Localización de los complejos de replicación y transcripción (RTCs) de BEV

3.1 Distribución de las proteínas virales que forman los RTCs de BEV

Para identificar los RTCs de los torovirus se emplearon los sueros previamente producidos y caracterizados frente a la RdRp, M^{pro} y la Hel de BEV, tres proteínas clave en la función y formación de los RTCs de los nidovirus estudiados. En primer lugar se estudió la localización subcelular de estas proteínas a lo largo de la infección mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para ello, se infectaron cultivos de células E.Derm con BEV, se fijaron a distintos tiempos post-infección y se inmunomarcaron con los distintos sueros generados frente a las nsps Hel, RdRp y M^{pro}. Las proteínas estudiadas presentaron un patrón de distribución subcelular prácticamente idéntico entre ellas a lo largo de la infección. Como ejemplo, en la figura 6A se muestra el patrón obtenido con la M^{pro} utilizando el suero generado en ratas. En esta figura se puede observar que la mayoría

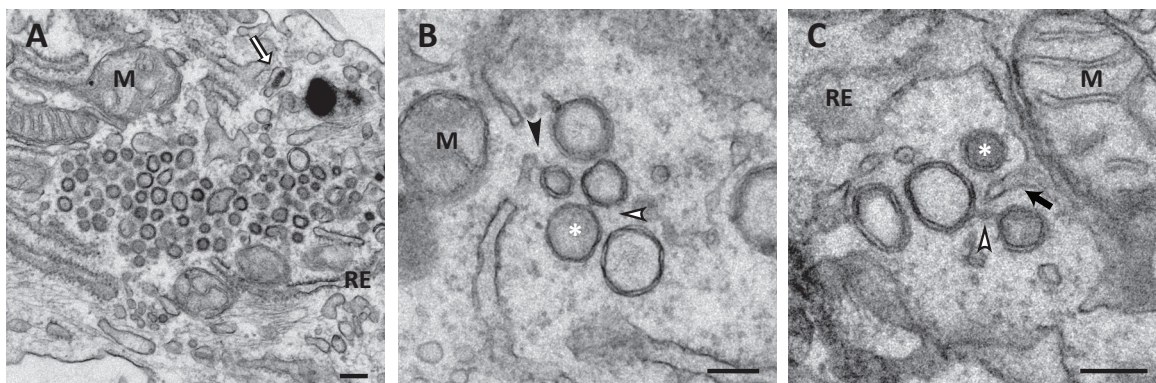


Figura 4. Análisis ultraestructural de células humanas MRC5 infectadas con BEV.

Micrografías de células MRC5 infectadas con BEV a 16 hpi y embebidas en resina TAAB-812 en las que se observa la presencia de DMVs. **A)** Región de DMVs rodeada de mitocondrias y RE. **B-C)** DMVs conectadas entre ellas o con conexiones con el RE o con el MAM. M mitocondria; RE retículo endoplasmático; los asteriscos señalan DMVs; la flecha blanca señala partículas virales; el triángulo negro señala la conexión RE-DMVs; el triángulo blanco señala la conexión DMV-DMV; la flecha negra conexión MAM-DMV. Barra 200 nm.

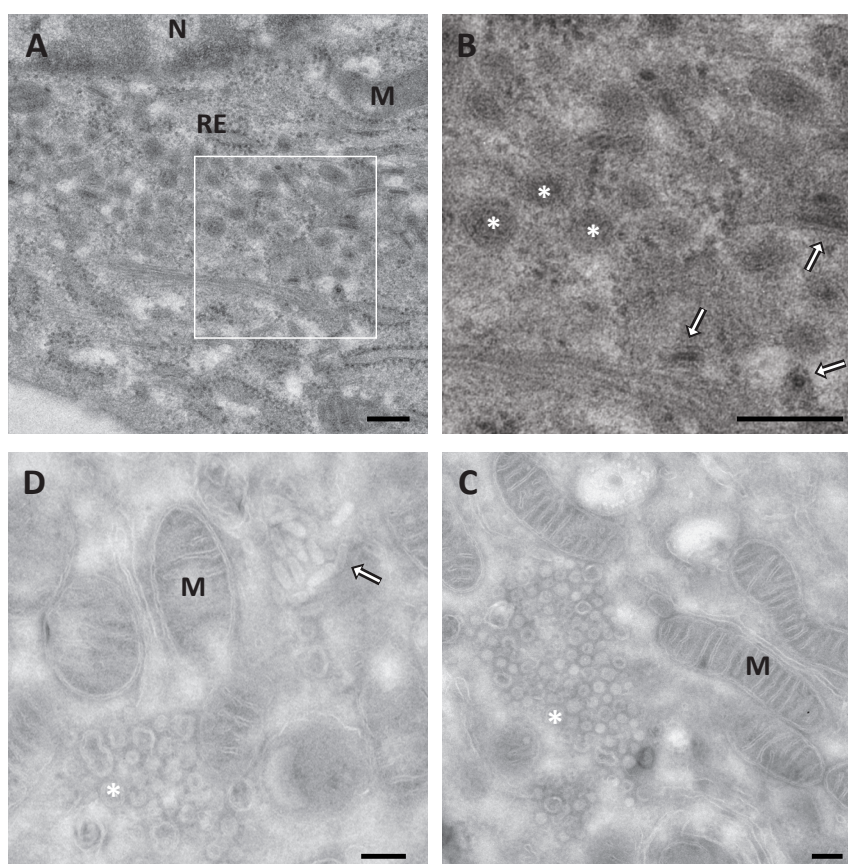


Figura 5. Análisis ultraestructural de las DMVs inducidas por BEV en secciones de células tratadas mediante criosustitución o en criocortes. Micrografías de células E.Derm infectadas con BEV durante 16 h. **A-B)** Las células fueron procesadas mediante criosustitución antes de incluirlas en resina lowicryl HM20, **B)** zona ampliada de A). **C-D)** Las células fueron procesadas para generar criocortes. M mitocondria; RE retículo endoplasmático; N núcleo; el asterisco señala DMVs; la flecha blanca señala partículas virales. Barra 200 nm

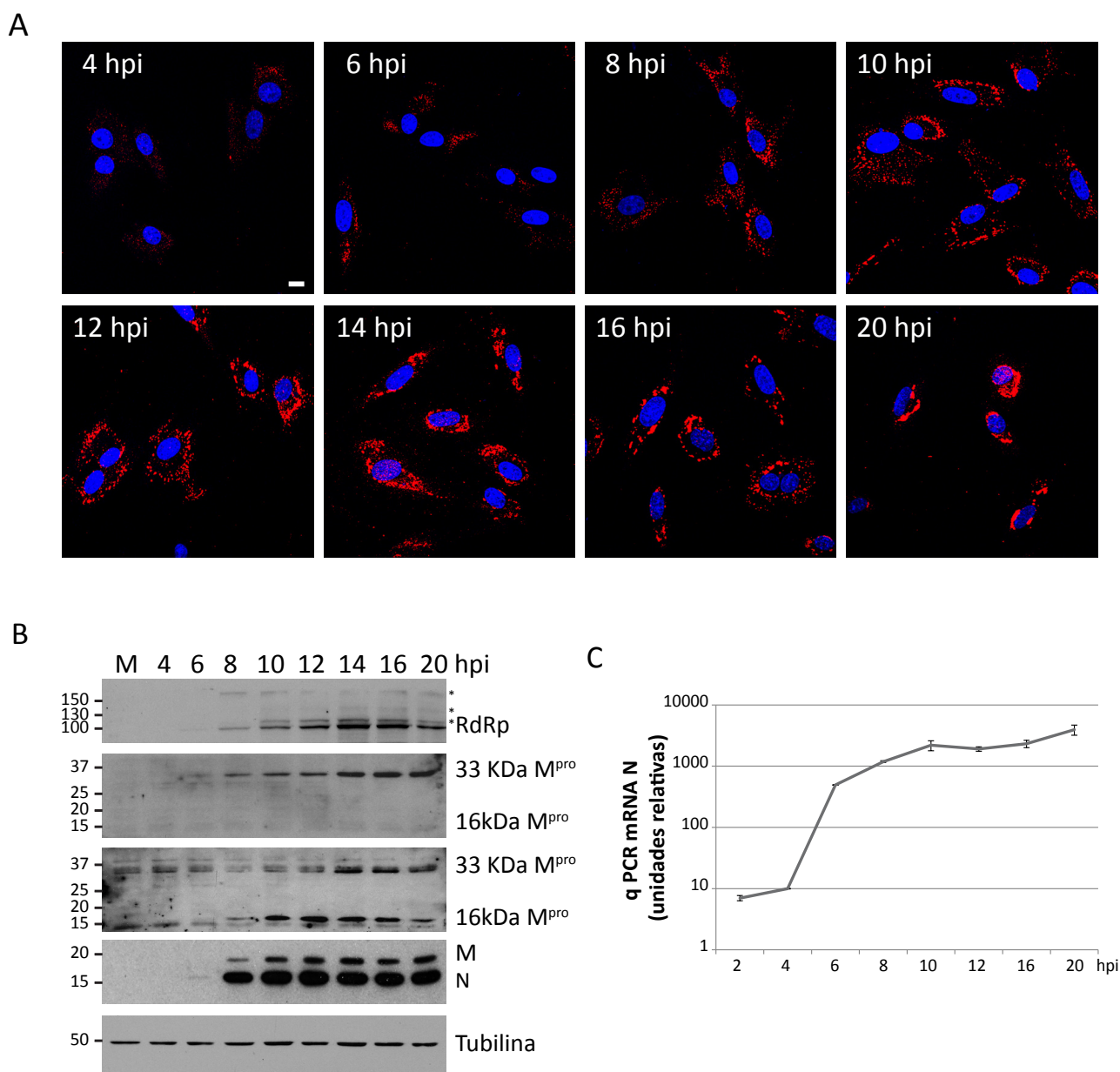
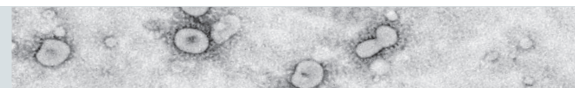


Figura 6. Distribución de las proteínas virales que forman los RTC de BEV.

A) Inmunofluorescencia de células E.Derm infectadas con BEV, que fueron fijadas a los tiempos indicados, e incubadas con el anticuerpo Rt anti-M^{pro} (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras de 10 µm. **B)** Análisis mediante inmunoblot de extractos de células E.Derm sin infectar (M) o infectadas con BEV, recogidos a los tiempos indicados e incubados con los sueros Rb anti-RdRp, Rt anti-M^{pro}, Rb anti-M^{pro}, Rb anti-M, Rb anti-N y Mo anti-tubulina. A la izquierda se muestra la posición y tamaño de los marcadores de peso molecular en kDa. El asterisco indica especies intermedias del procesamiento de las poliproteínas pp1a/pp1ab. **C)** Cuantificación del RNA viral producido a los tiempos indicados medido por qRT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región codificadora de la proteína N. Los datos fueron normalizados frente al mRNA celular correspondiente a la proteína HPRT1.

de las células presentan una señal específica a las 6 hpi, aunque a 4 hpi ya se pueden observar algunas células marcadas, siendo a partir de las 8 hpi cuando se produce un fuerte incremento en la intensidad de señal. A tiempos tempranos

las proteínas se localizaron en pequeños puntos o áreas dispersas por toda la célula, las cuales evolucionan a áreas mucho más densas localizadas alrededor del núcleo entre las 10-14 hpi, tendiendo a aproximarse hacia el núcleo conforme avanza la



infección. El estudio no se prolongó más allá de las 20 hpi al considerar los tiempos posteriores muy tardíos para la replicación. La liberación extracelular de viriones de BEV alcanza su fase estacionaria a las 16 hpi y se prolonga hasta las 24 hpi, siendo a partir de las 21 hpi cuando comienzan a observarse efectos citopáticos en las células infectadas (Weiss y col., 1986), que desembocan en apoptosis (Maestre y col., 2011).

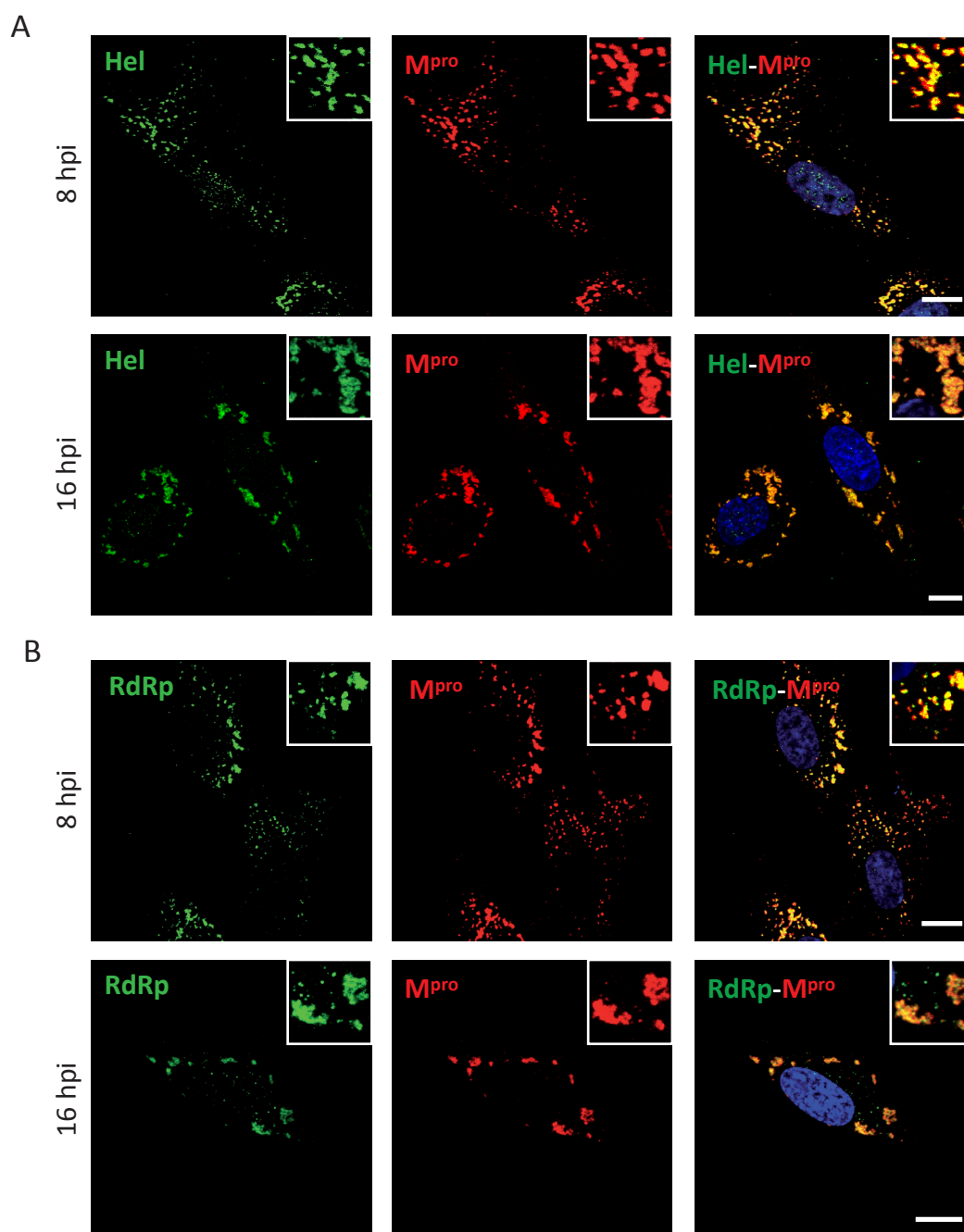
En la misma línea, se analizaron por inmunoblot extractos de células E.Derm infectadas con BEV y recogidas a distintos tiempos post-infección. Mediante este ensayo se observó que tanto la RdRp como la M^{pro} en sus dos formas, 16 y 33 kDa, se acumulan progresivamente desde las 8 hpi (Fig. 6B) en adelante, aunque es cierto que ambas proteínas se pueden observar desde las 6 hpi con tiempos de exposición más prolongados. De manera similar, las proteínas estructurales N (17 kDa) y M (20 kDa) también se observan a partir de las 6 hpi, pero a diferencia de las nsps, estas sufren un incremento exponencial desde las 6 hpi a las 10 hpi. A su vez, la dinámica de acumulación de proteínas virales está en concordancia con la dinámica de acumulación de RNA viral, medido por qRT-PCR, con un incremento exponencial desde las 4 hpi hasta las 10 hpi (Fig. 6C).

3.2 Colocalización entre las proteínas virales que forman los RTCs de BEV

Para determinar si realmente las nsps comparten una misma localización intracelular formando parte de los RTCs de BEV, el anticuerpo anti-M^{pro} generado en rata fue usado en un ensayo de coinmunomarcage junto con los sueros de conejo anti-RdRp y anti-Hel, en células E.Derm infectadas con BEV y fijadas a diferentes tiempos post-infección. Como se muestra en la figura 7 ambas proteínas, la Hel (Fig. 7A) y la RdRp (Fig. 7B), muestran un alto grado de colocalización con la M^{pro} a 8 hpi y 16 hpi. El ensayo se realizó también a 12 hpi obteniéndose un resultado muy similar (datos no mostrados). Para obtener datos cuantitativos sobre el grado de colocalización

determinamos el coeficiente de correlación de Pearson's (PC) para cada par de proteínas (Fig. 7D). Por definición, los valores de PC oscilan desde -1 (correlación negativa perfecta) a 1 (correlación positiva perfecta), indicando el 0 que no existe correlación lineal entre ambas variables. Solo los valores de PC superiores a 0,5 fueron considerados como verdadera colocalización. Como se observa en el gráfico, el grado de colocalización entre todas las nsps fue relativamente alto, con valores de PC para la Hel-M^{pro} de $0,78 \pm 0,04$ a 8 hpi, $0,76 \pm 0,03$ a 12 hpi y $0,65 \pm 0,04$ a 16 hpi. Para la RdRp-M^{pro} se obtuvieron valores similares, con un PC de $0,75 \pm 0,03$ a 8 hpi, $0,82 \pm 0,02$ a 12 hpi y $0,70 \pm 0,03$ a 16 hpi. Estos resultados confirman que las nsps de BEV Hel, RdRp y M^{pro} se localizan en la misma zona, la cual, con gran probabilidad, es el lugar donde ocurre la replicación y transcripción viral.

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios similares utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína estructural M de BEV. Previamente, nuestro grupo describió que a tiempos tempranos de infección la proteína M se acumula en la región perinuclear de la célula, concretamente en el compartimento intermedio ERGIC donde tiene lugar el ensamblaje del virus, y posteriormente aparece acumulada en la superficie de la célula una vez incorporada en las partículas de la progenie viral (Garzon y col., 2006). En la figura 7C se observa como la proteína M no colocaliza con la M^{pro}. Ambas proteínas tienen una distribución diferente a lo largo de la infección, como confirma el estudio de colocalización cuantitativa, donde se obtuvieron valores de PC inferiores a 0,5 ($0,22 \pm 0,03$ a 8 hpi, $0,27 \pm 0,03$ a 12 hpi y $0,24 \pm 0,06$ a 16 hpi) (Fig. 7D). Dado que las proteínas M y S colocalizan entre sí a lo largo de la infección de manera similar a como lo hacen las nsps (datos del laboratorio no publicados), se puede considerar que la ausencia de colocalización entre la proteína estructural M y la M^{pro} indica que los sitios de replicación y transcripción de BEV están separados de los sitios de ensamblaje del virus.



3.3 Localización intracelular del RNA viral involucrado en la replicación y transcripción de BEV

Para caracterizar los RTCs de virus RNA de cadena positiva, que generan dúplex de RNA como intermediarios de la replicación, se han utilizado ampliamente anticuerpos que detectan dsRNA (Lee y col., 1994; Mackenzie y col., 1996; Targett-Adams y col., 2008; Westaway y col., 1997; Westaway y col., 1999). Por esta razón, realizamos inmunomarcajes de células E.Derm infectadas con

BEV y fijadas a intervalos de 2 h con un anticuerpo anti-dsRNA. La marca del dsRNA fue detectada exclusivamente en las células infectadas y se caracterizó por ser una señal en forma de puntos pequeños y brillantes que se localizan dispersos por el citoplasma (Fig. 8A). El número de puntos de dsRNA aumenta rápidamente a medida que avanza la infección hasta las 10 hpi, se mantiene en valores similares entre 10 y 16 hpi, y desciende de las 16 hpi en adelante. Realizamos ensayos de colocalización similares a los realizados entre

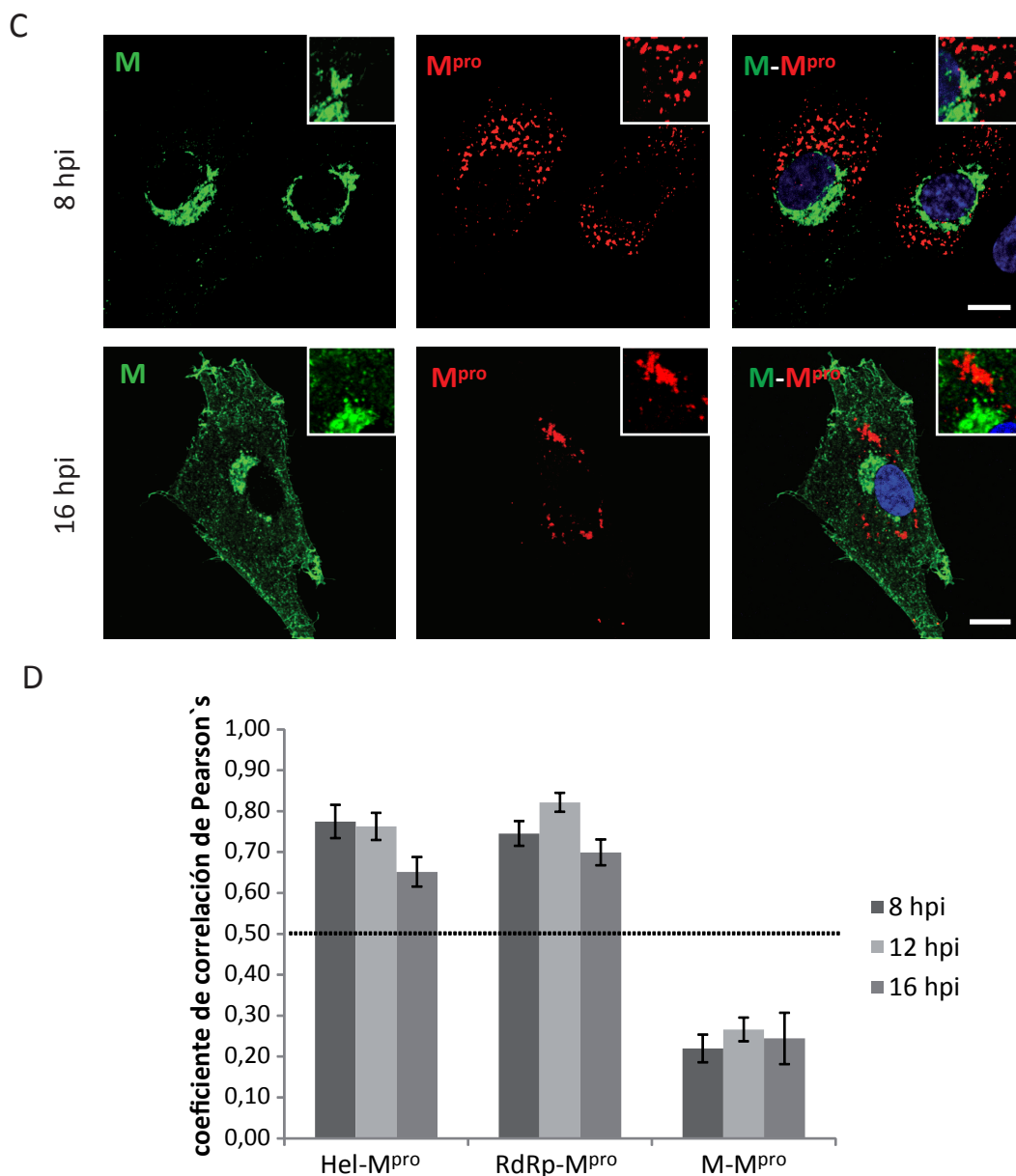
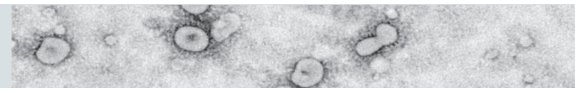


Figura 7. Análisis de colocalización entre las proteínas virales que forman los RTC de BEV.

A-C) Se infectaron células E.Derm con BEV y se fijaron a las 8 hpi y 16 hpi y se procesaron para inmunofluorescencia en un ensayo de coinmunomarcado utilizando el suero Rt anti-M^{pro} (rojo) con los sueros: **A)** Rb anti-Hel, **B)** Rb anti RdRp o **C)** Rb anti M (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (Azul). Las áreas recuadradas muestran zonas representativas a mayor magnificación. Barras de 10 μ m. **D)** Análisis cuantitativo del grado de colocalización. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson's para cada doble marcaje a 8, 12 y 16 hpi, utilizando imágenes con aproximadamente 20 células (n=5). Solo se consideraron los valores superiores a 0,5 como indicativos de verdadera colocalización.

las nsps, pero en este caso no observamos una clara colocalización entre la M^{pro} y el dsRNA (Fig. 8B) a los tiempos estudiados. Además, el análisis cuantitativo muestra un valor de PC inferior a 0,5 en todos los tiempos analizados en el ensayo ($0,13 \pm 0,03$ a 8 hpi, $0,13 \pm 0,02$ a 12 hpi y $0,10 \pm 0,01$ a 16 hpi) (Fig. 10B). Sin embargo, podemos observar que las señales de dsRNA y la M^{pro} están muy próximas

entre ellas en muchas áreas, de hecho, un gran porcentaje de puntos de dsRNA muestran una colocalización parcial o están rodeados por la M^{pro}.

Por otra parte, aunque hemos determinado que las nsps de BEV presentan un alto grado de colocalización entre sí, como la M^{pro} no es una proteína directamente involucrada en el proceso de replicación y transcripción, se decidió

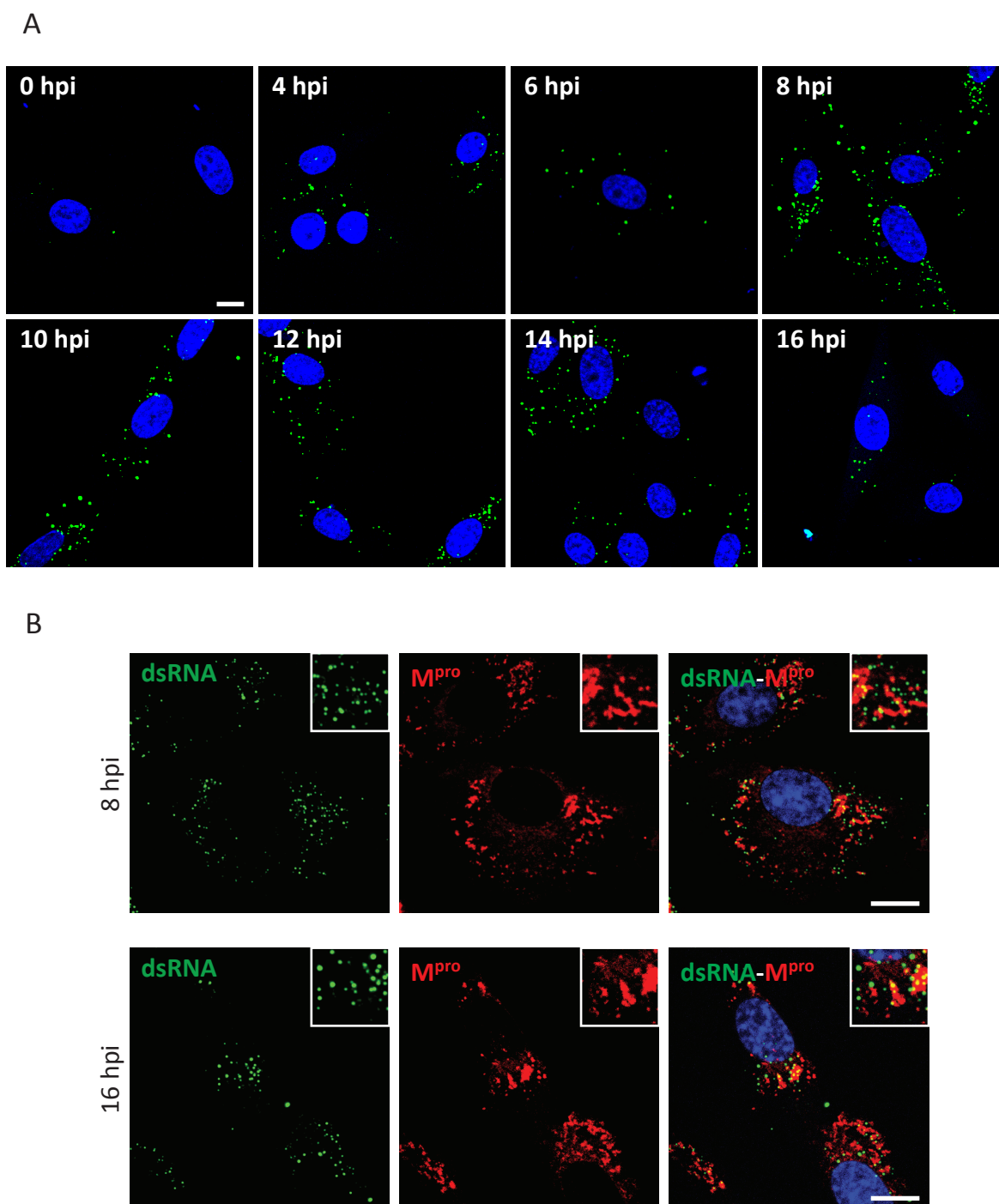
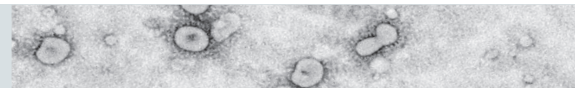


Figura 8. Localización y distribución del dsRNA viral.

A) Inmunofluorescencia de células E.Derm infectadas con BEV, que fueron fijadas a los tiempos indicados, e incubadas con un anticuerpo anti-dsRNA (verde). **B)** Ensayo de coimmunomarcage de células E.Derm infectadas y fijadas a 8 y 16 hpi, utilizando el anticuerpo anti-dsRNA (verde) y el suero Rt anti-M^{pro} (rojo). Las áreas recuadradas muestran zonas representativas a mayor magnificación. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Azul). Barra 10 μm.

ampliar los análisis utilizando los anticuerpos anti-Hel y anti-RdRp. Como se esperaba, el resultado obtenido no difirió significativamente del obtenido con la M^{pro} (Fig. 9 y Fig. 10B). Estos resultados

están en sintonía con los obtenidos para otros miembros de los nidovirus, donde únicamente se ha observado una colocación parcial entre el dsRNA y las proteínas implicadas en la replicación



y la transcripción viral (Hagemeijer y col., 2012; Knoops y col., 2008; Knoops y col., 2012; Maier y col., 2013b). En el caso de EAV y MHV se ha descrito colocación entre el dsRNA y las nsps pero a tiempos muy tempranos de infección (Hagemeijer y col., 2012; Knoops y col., 2012). Para estudiar esta posibilidad se repitieron los análisis a 6 hpi. En nuestro caso no se observó solapamiento entre el dsRNA y las nsps, obteniendo valores de PC de $0,11 \pm 0,02$ para la M^{pro} , $0,10 \pm 0,02$ para la Hel y $0,11 \pm 0,2$ para la RdRp, mientras que los valores de las nsps entre sí fueron superiores a 0,5.

En vista de los resultados anteriores, con el objetivo de determinar si las nsps de BEV están localizadas en los sitios donde se produce la síntesis de RNA viral, se analizó la localización intracelular del RNA viral de nueva síntesis. Para ello, el RNA de células E.Derm infectadas con BEV fue marcado con 5-BrU durante una hora antes de la fijación de la célula, tal y como se describe en materiales

y métodos. Para evitar el marcaje del RNA celular se bloqueó su síntesis mediante el tratamiento con Act D durante el mismo periodo. Una vez fijadas, las células fueron inmunomarcadas con un anticuerpo anti-BrU y el anticuerpo frente a M^{pro} . Como muestra la figura 10, el RNA naciente muestra una distribución muy similar a la obtenida con las nsps. Se detecta por primera vez entre las 4 y las 6 hpi, aunque al igual que ocurre con las nsps la señal fue más aparente desde las 8 hpi, siguiendo incrementando a lo largo de la infección hasta las 16 o 18 hpi, tiempo en el cual la síntesis de RNA viral finaliza en muchas células. Este resultado indica que la síntesis del RNA viral tiene lugar mayoritariamente entre las 8 y las 14 hpi, y cesa sobre las 16 hpi. Los ensayos de coinmunomarcaje muestran una clara colocación entre el RNA naciente y la M^{pro} (Fig. 10A), corroborada cuantitativamente a 8 y 12 hpi, con un valor de PC de $0,57 \pm 0,02$ y $0,58 \pm 0,02$ respectivamente (Fig. 10B). Sin embargo, a 16 hpi se

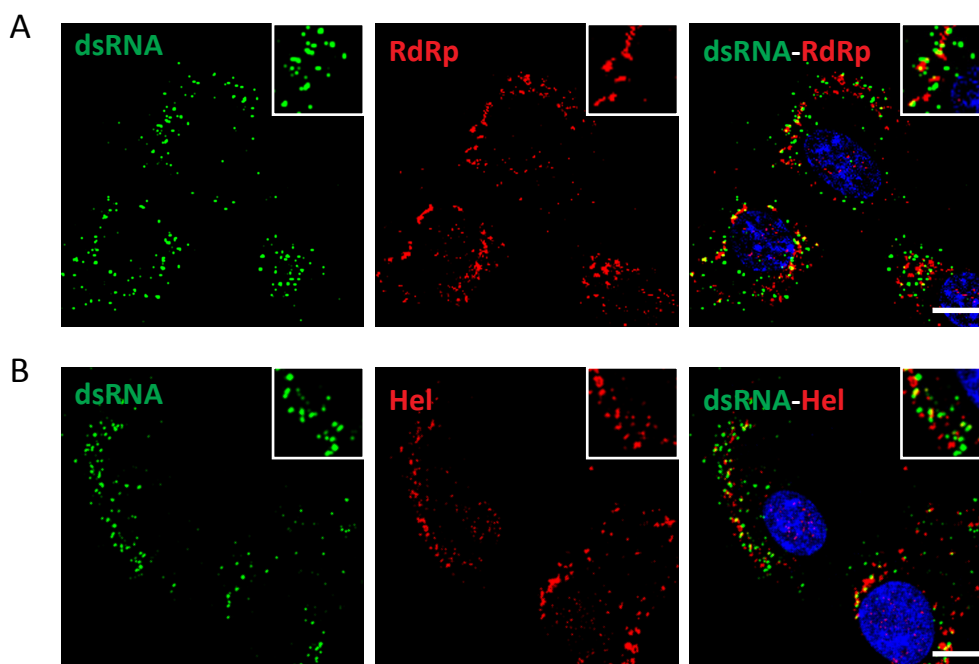


Figura 9 Ensayo de colocación entre las proteínas virales implicadas en replicación y el dsRNA.

Inmunofluorescencia de células E.Derm infectadas con BEV, fijadas a 8 hpi y procesadas para un ensayo de coinmunomarcaje con el anticuerpo anti-dsRNA (rojo) y con los sueros: **A)** Rb anti-Hel y **B)** Rb anti RdRp (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (Azul). Las áreas recuadradas muestran zonas representativas a mayor magnificación. Barra 10 μ m.

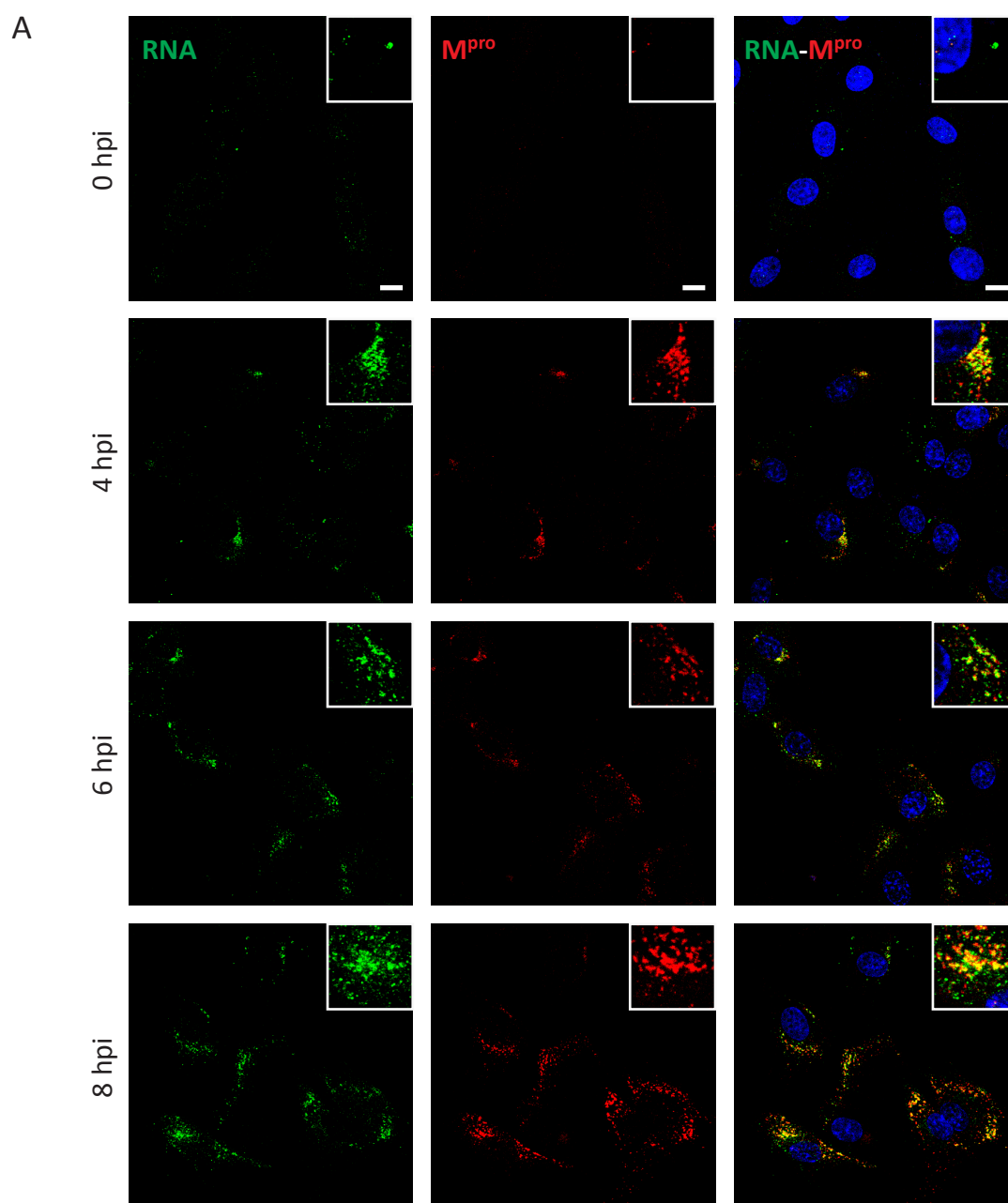
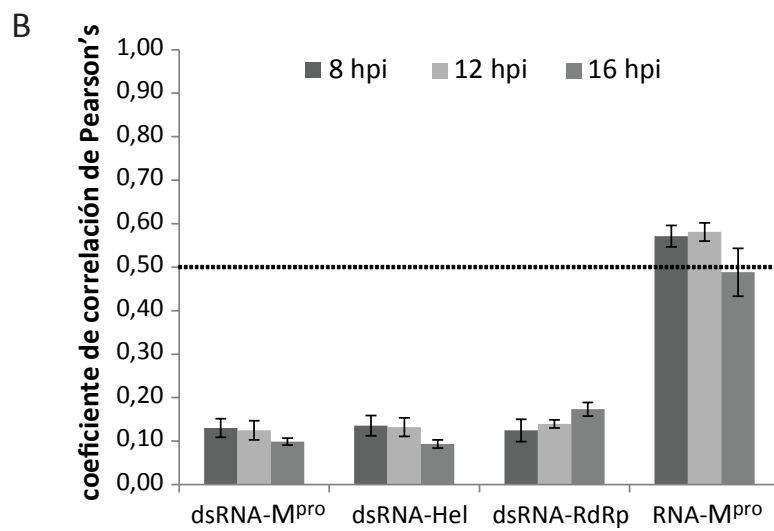
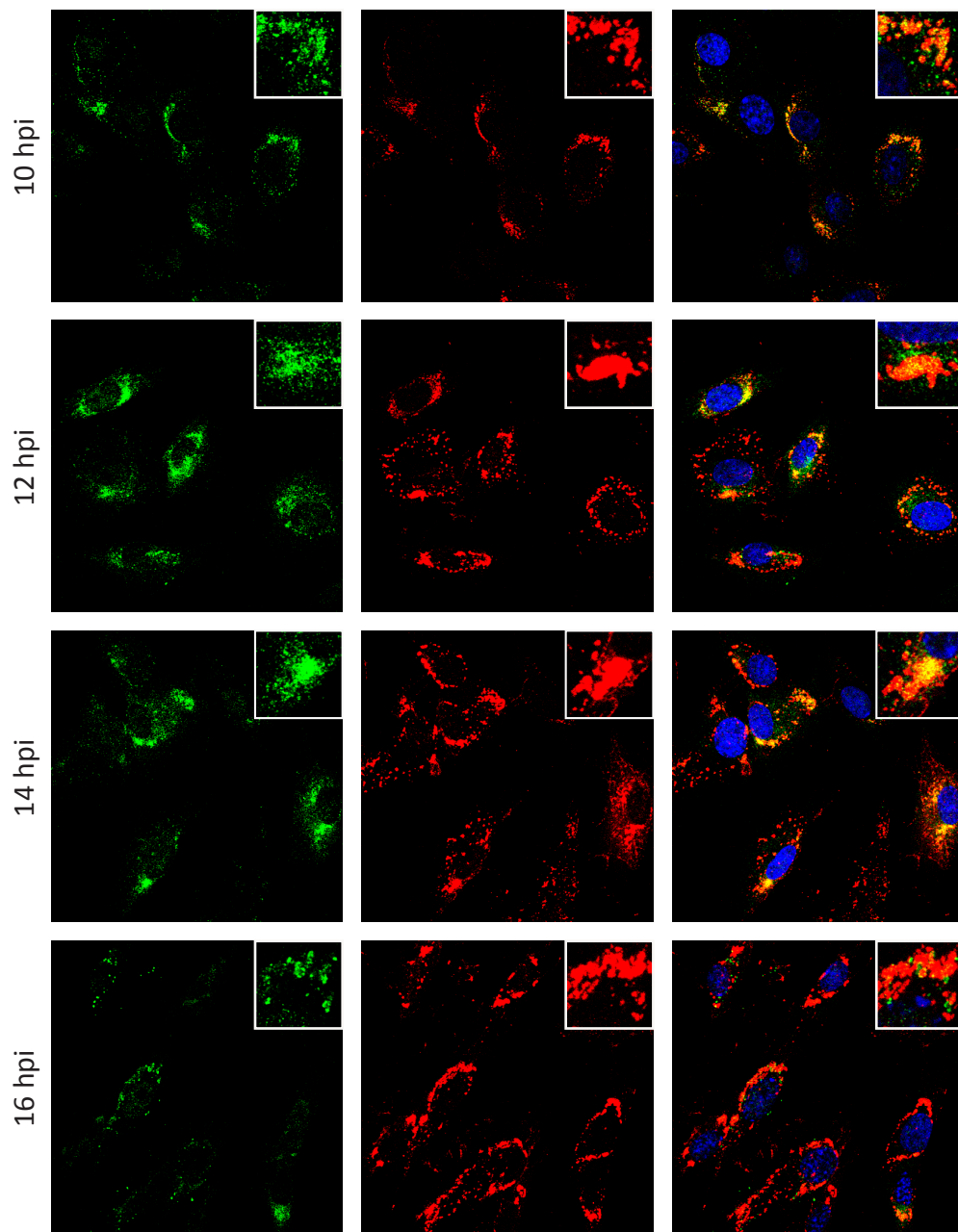
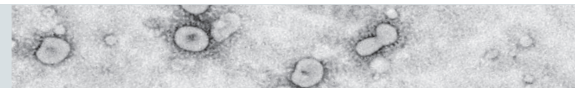


Figura 10. Localización y distribución del RNA viral de nueva síntesis.

A) El RNA viral producido en las células E.Derm infectadas con BEV fue marcado con 5'BrU durante una hora antes de la fijación de las células a los tiempos indicados. Durante el mismo periodo se bloqueó la transcripción celular mediante el tratamiento con ActD. Una vez fijadas, estas células fueron procesadas para inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo Rt anti-M^{pro} (rojo) y un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (verde) para detectar el RNA de nueva síntesis. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las áreas recuadradas muestran zonas representativas a mayor magnificación. Barra 10 μ m. **B)** Análisis cuantitativo del grado de colocalización. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson's para cada doble marcaje a 8, 12 y 16 hpi utilizando imágenes con aproximadamente 20 células (n=5). Además del grado de colocalización entre el RNA de nueva síntesis y la M^{pro}, se incluyeron los análisis de colocalización entre el dsRNA y las proteínas de replicación M^{pro}, Hel y RdRp (Figura 8b y 9). Solo se consideraron los valores superiores a 0,5 como indicativos de verdadera colocalización.

observa un valor ligeramente inferior a 0,5 ($0,48 \pm 0,06$) que puede ser explicado por la finalización de la síntesis de RNA viral en muchas de las células

a este tiempo, ya que en aquellas células donde aún se observa la señal de RNA el valor de PC es muy parecido al obtenido a 8 y 12 hpi.



Como podemos observar en la figura 10, no todos los sitios positivos para el RNA naciente fueron positivos para la M^{pro} . Para caracterizar más a fondo esta observación se realizó un triple ensayo de fluorescencia en el que además de la M^{pro} y el RNA se incluyó la proteína estructural M (Fig. 11). Es interesante ver como a 8 hpi aquellas áreas negativas para la M^{pro} (Fig. 11 E y F) pero positivas para el RNA de nueva síntesis son también positivas para la proteína estructural M. Este resultado plantea la posibilidad de que estas áreas correspondan con zonas activas de traducción de proteínas, concretamente de las proteínas estructurales de BEV.

4. La replicación y la transcripción en BEV está asociada a las DMVs

Según los estudios realizados en EAV, MHV y SARS-CoV (Gosert y col., 2002; Pedersen y col., 1999; van Hemert y col., 2008b) las DMVs serían el sitio donde se anclan los complejos de replicación y transcripción (RTCs) en los nidovirus. Para estudiar la relación de las DMVs inducidas por BEV con los procesos de replicación y transcripción se utilizaron criosecciones de células E.Derm infectadas con BEV y fijadas a 16 hpi, las cuales fueron inmunomarcadas con el anticuerpo monoclonal anti-dsRNA o con los sueros anti-RdRp o anti- M^{pro} , y detectadas mediante el uso de proteína A conjugada con oro coloidal. En la figura 12A (panel de la izquierda) se muestra una imagen representativa de este marcaje, en donde el dsRNA se observa en el interior de las DMVs. Aunque solo algunas DMVs están marcadas, la señal está exclusivamente restringida al interior de esas DMVs. En las criosecciones marcadas con los sueros anti-RdRp (Fig. 12A panel central) o anti- M^{pro} (Fig. 12A panel de la derecha) se observa un patrón completamente diferente. Ambas señales, RdRp o M^{pro} , se localizan claramente en el área de las DMVs, pero están específicamente asociadas a la parte membranosa de las mismas, así como a las membranas adyacentes que las rodean, mientras

que el interior de las DMVs permanece en general libre de señal, aunque ocasionalmente se puede observar alguna partícula de oro en el interior de alguna DMV.

Probablemente los RTCs de BEV están anclados a membrana tal y como indica la predicción de dominios transmembrana en la replicasa de BEV, localizados en las subunidades nsp1, nsp2 y nsp4. Para analizar si la RdRp y la M^{pro} de BEV son proteínas asociadas a membrana, células E.Derm no infectadas o infectadas con BEV fueron homogeneizadas a las 16 hpi y sometidas a ultracentrifugación diferencial con el objetivo de sedimentar la fracción membranosa (P100) y separarla de la fracción citosólica (S100). Ambas fracciones fueron analizadas mediante inmunoblot utilizando GAPDH como proteína marcadora de citosol y las Caderinas como marcadoras de fracción membranosa. Como muestra la figura 12B, ambas proteínas, RdRp y M^{pro} fueron localizadas exclusivamente en la fracción membranosa.

De los ensayos de inmunomarcaje realizados sobre criosecciones claramente se puede deducir que el dsRNA está localizado en el interior de las DMVs, rodeado a su vez por una serie de nsps ancladas a la membrana. Sin embargo este patrón fue menos evidente en los ensayos de inmunofluorescencia mostrados previamente en la figura 8. Por esta razón, se repitió el ensayo de fluorescencia entre el dsRNA y la M^{pro} y se capturaron nuevas imágenes de microscopia confocal con la adquisición en z optimizada para generar una imagen en volumen (Fig. 13). La reconstrucción tridimensional obtenida se muestra en la figura 13B donde podemos observar en volumen tanto el dsRNA como la M^{pro} en una visión cenital. En la reconstrucción queda patente, como ya habíamos observado, que la mayoría del dsRNA está en contacto con la M^{pro} , aunque hay una pequeña parte que se muestra aislado. No obstante, lo verdaderamente sorprendente fue la observación de que parte del dsRNA se localiza en el interior de la masa que forma la M^{pro} (Fig. 13C (Video 1)) cuando se muestran secciones del volumen.

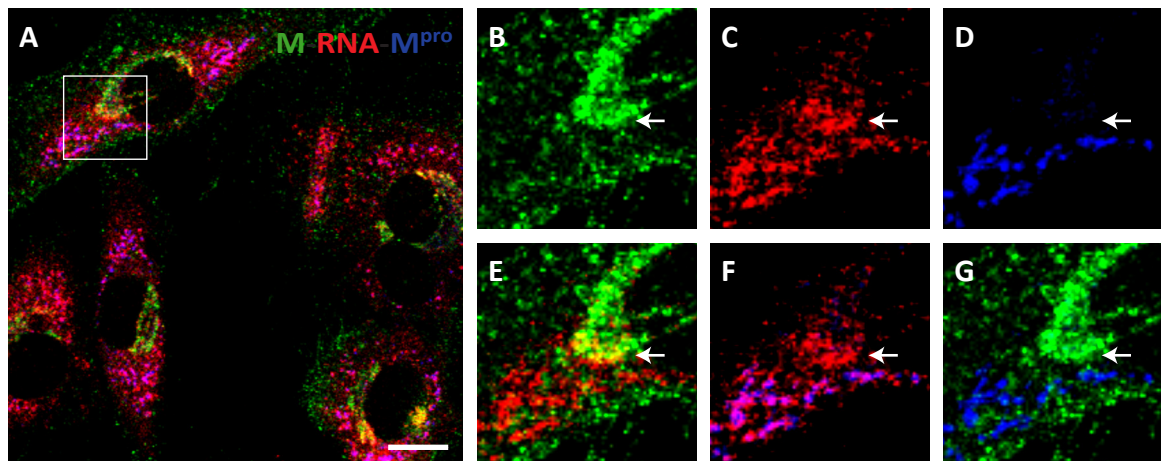


Figura 11. El RNA de nueva síntesis presenta una colocación parcial con la proteína estructural M.

Células E.Derm infectadas con BEV fueron tratadas como se describe en la leyenda de la figura R10 antes de ser fijadas a las 8 hpi. **A)** Triple ensayo de colocalización utilizando los sueros Rb anti-M (verde), Mo anti-BrdU (rojo) y Rt anti-M^{pro} (azul). El área recuadrada indica una zona representativa que se muestra ampliada en los paneles, B-G. **B)** señal correspondiente a la proteína M; **C)** señal correspondiente al RNA de nueva síntesis; **D)** señal correspondiente a la proteína M^{pro}; **E)** superposición de las señales de la proteína M y el RNA; **F)** superposición de las señales de la proteína M^{pro} y el RNA; **G)** superposición de las señales de las proteínas M y M^{pro}. La flecha indica el área de colocalización parcial entre la proteína M y el RNA. Barra 10 μm.

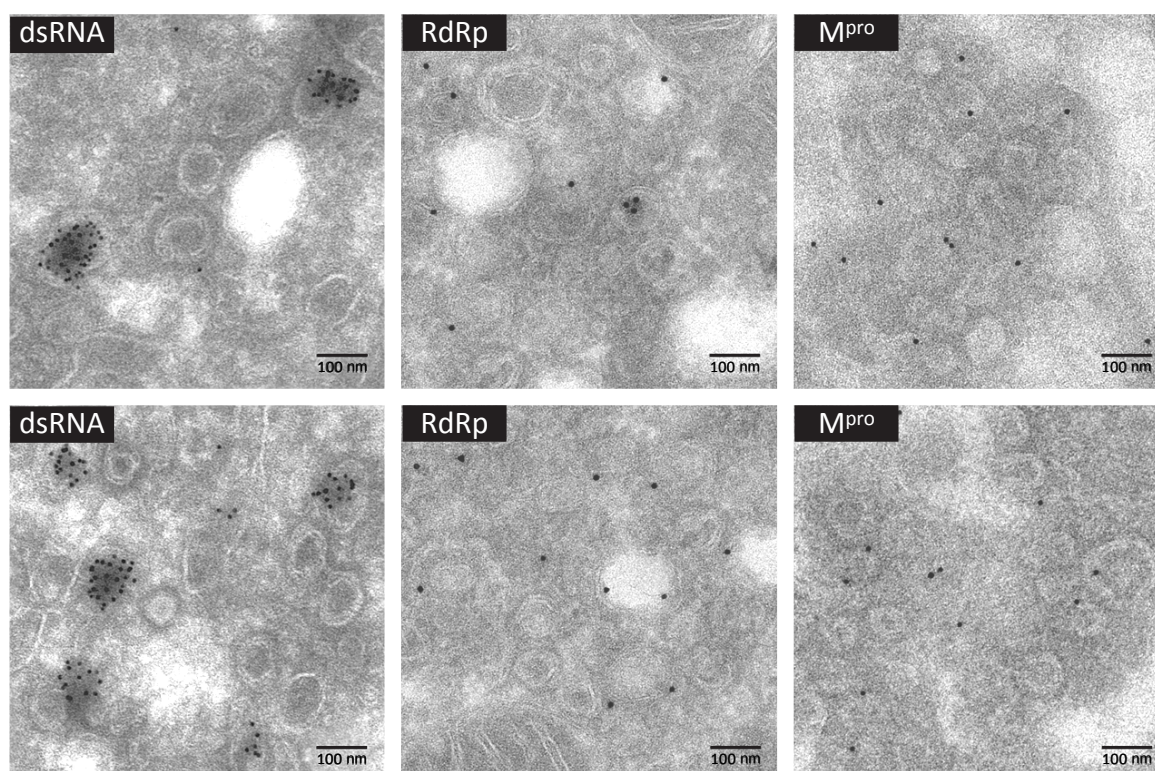
5. Origen membranoso de las DMVs inducidas por BEV

Para determinar cuáles es el orgánulo donante de membrana a partir del cual se forman las DMVs se utilizó un amplio panel de anticuerpos. Para ello, se utilizaron células E.Derm infectadas con BEV, fijadas a diferentes tiempos post-infección (8, 10, y 16 hpi) y utilizadas en ensayos de colocalización tras ser inmunomarcadas con el suero anti-M^{pro} y anticuerpos frente a proteínas marcadoras de los orgánulos ensayados. Como muestra la figura 14 (se muestran ejemplos representativos a 10 hpi), se probó con un marcador del aparato de Golgi como TGN46 (Fig. 14A), un marcador del compartimento intermedio como es la proteína p53 del ERGIC (Fig. 14B), marcadores de RE como son el PDI y la calnexina (Fig. 14C-D), un marcador del MAM como es el receptor Sigma1 (S1R) (Fig. 14F) y un marcador de endosoma temprano como es EEA1 (Fig. 14H). Además, se utilizó la sonda MitoTracker para marcar mitocondrias (Fig. 14E), y la expresión ectópica de GFP-Lamp1 como marcador de lisosoma (Fig. 14G). Todos los marcadores celulares fueron probados también en

células sin infectar, y a excepción del ERGIC p53, ninguna proteína mostró un patrón diferente entre las células infectadas y no infectadas (resultados no mostrados). Como previamente comentamos el ERGIC es el compartimento donde se acumulan las proteínas estructurales y por ello se ve modificado.

Como se muestra en la figura 14, ningún de los marcadores utilizados en este ensayo mostró colocalización con la proteína M^{pro} a ninguno de los tiempos estudiados, aunque es cierto que las señales del PDI, calnexina, S1R y mitotracker se observaron rodeando o parcialmente solapando con la señal de la M^{pro}. De igual forma, aunque el análisis cuantitativo de colocalización muestra valores de PC inferiores a 0,5, los valores con PDI ($0,36 \pm 0,03$), calnexina ($0,30 \pm 0,04$), S1R ($0,37 \pm 0,04$) o Mitotracker ($0,38 \pm 0,05$) son ligeramente superiores que los de EEA1 ($0,03 \pm 0,01$), ERGIC ($0,13 \pm 0,05$), TGN46 ($0,10 \pm 0,02$) o Lamp1 ($0,05 \pm 0,03$), reforzando la idea de una colocalización parcial. Estos resultados estarían en concordancia con lo observado en los estudios de microscopia electrónica (Fig. 3-4), donde las DMVs se observaron rodeadas por RE y mitocondrias, e

A



B

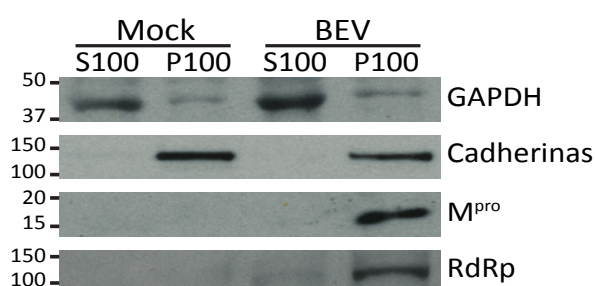


Figura 12. Relación entre la formación de DMVs y los RTCs de BEV.

A) Inmunomarcaje de criosecciones de células E.Derm infectadas con BEV y fijadas a 16 hpi utilizando el anticuerpo monoclonal anti-dsRNA (panel izquierdo), o los sueros Rb anti-RdRp (panel central) o M^{pro} (panel derecho). Barra 100 nm. **B)** Fraccionamiento subcelular de células E.Derm infectadas con BEV a 16 hpi o no infectadas (Mock). Las fracciones citosolicas (S100) y membranosas (P100) obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunoblot utilizando los sueros anti-M^{pro} y anti-RdRp. Además se incluyó un anticuerpo anti-GAPDH y otro anti-Cadherinas como control de proteínas citosólicas y membranosas, respectivamente. A la izquierda se muestra la posición y tamaño de los marcadores de peso molecular en kDa.

incluso en algunas ocasiones con conexiones entre ellas y el RE o el MAM.

Nuevamente, los resultados obtenidos con BEV están de acuerdo con los obtenidos en otros nidovirus (Ivanov y col., 2004a; Knoops y col., 2010; Shi y col., 1999; Snijder y col., 2006; Ulasli

y col., 2010), donde el origen de la membrana de las DMVs está cuestionado, ya que los marcadores tradicionales utilizados para marcar los orgánulos celulares no colocan, o solo lo hacen parcialmente, con las proteínas de la replicasa viral.

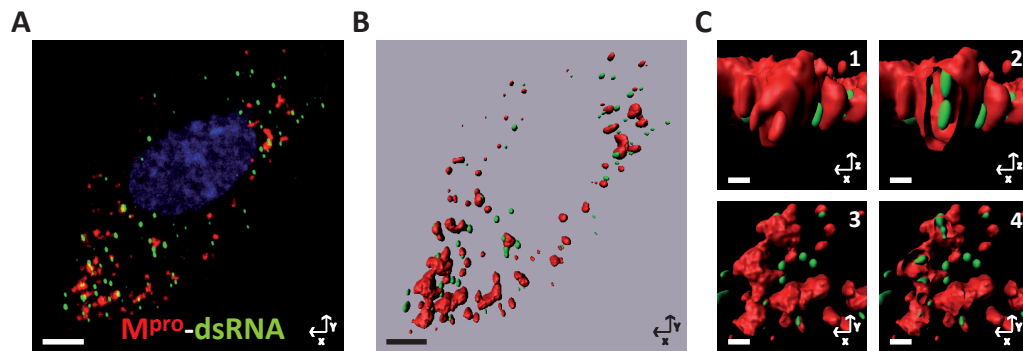


Figura 13. Reconstrucción tridimensional de las imágenes de microscopía confocal: dsRNA-M^{pro}. Se capturaron una serie de imágenes consecutivas de microscopía confocal con un *z-step* optimizado, a partir de células E.Derm infectadas con BEV, fijadas a las 8 hpi e inmunomarcadas con los anticuerpos anti-dsRNA (verde) y anti-M^{pro} (rojo), y tratadas con DAPI para teñir los núcleos (azul). **A)** Proyección en el eje Z de las imágenes capturadas. **B)** Visión general de la reconstrucción 3D generada a partir de las imágenes de confocal utilizando el *software* Imaris (Bitplane AG). Barra 5 μm. **C)** Región ampliada de la reconstrucción 3D. C1) Visión Frontal. C2) Visión frontal de una sección vertical que muestra el dsRNA en el interior de la estructura marcada con el anticuerpo M^{pro}. C3) Visión cenital. C4) Visión cenital de una sección transversal. Barra 0,5 μm.

Por otra parte, la formación de DMVs por distintos virus ha sido relacionada, por su propia naturaleza de vesículas de doble membrana, con los autofagosomas que se generan como consecuencia de la activación de la ruta autofágica en una célula. Por ello durante los estudios para localizar el origen membranoso de las DMVs también se probó con una proteína marcadora de autofagosomas, como es LC3B. Aunque en estos ensayos no se observó una clara colocación, si se apreció una posible redistribución de la proteína LC3B entorno a la proteína M^{pro} a tiempos tardíos de infección (Fig. 26). A la vista de estos resultados, nos pareció interesante determinar si BEV realmente induce autofagia. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios se describen en el capítulo III.

6. Formación de DMVs en células infectadas con el torovirus bovino Aichi

Recientemente se ha conseguido la propagación de diferentes cepas de BToV en cultivo celular gracias a los estudios del grupo del Dr. Tsunemitsu, en los que se describió por primera vez la infección con un aislado de

BToV, el aislado Aichi, en células humanas HRT-18 (Kuwabara y col., 2007). Ambos, células y virus, fueron generosamente cedidos por el Dr. Tsunemitsu para nuestros estudios. Una vez en el laboratorio, se realizaron ensayos preliminares en los que se observó que tras infectar las células HRT-18 con el virus Aichi los primeros efectos citopáticos aparecían a las 48 hpi, con células redondeadas que tienden a escindirse de la monocapa. A las 72 hpi el efecto es algo más evidente aunque no progresa visiblemente con el tiempo, siendo patente únicamente un efecto citopático en pequeños focos que no suponen más del 25% de las células de la monocapa. La infección se monitorizó mediante inmunoblot e inmunofluorescencia utilizando el suero frente a la proteína N de BEV, el cual reconoció la proteína N de Aichi. Mediante estos ensayos comprobamos que las 48 hpi es un tiempo de infección adecuado para su estudio (resultados no mostrados).

Para caracterizar los RTCs de Aichi, en primer lugar quisimos determinar la reactividad de los anticuerpos generados en el laboratorio frente a BEV con las proteínas del aislado de BToV. Para ello, analizamos extractos de células HRT-18 infectadas o no infectadas con el torovirus Aichi a 48 hpi mediante inmunoblot utilizando dichos

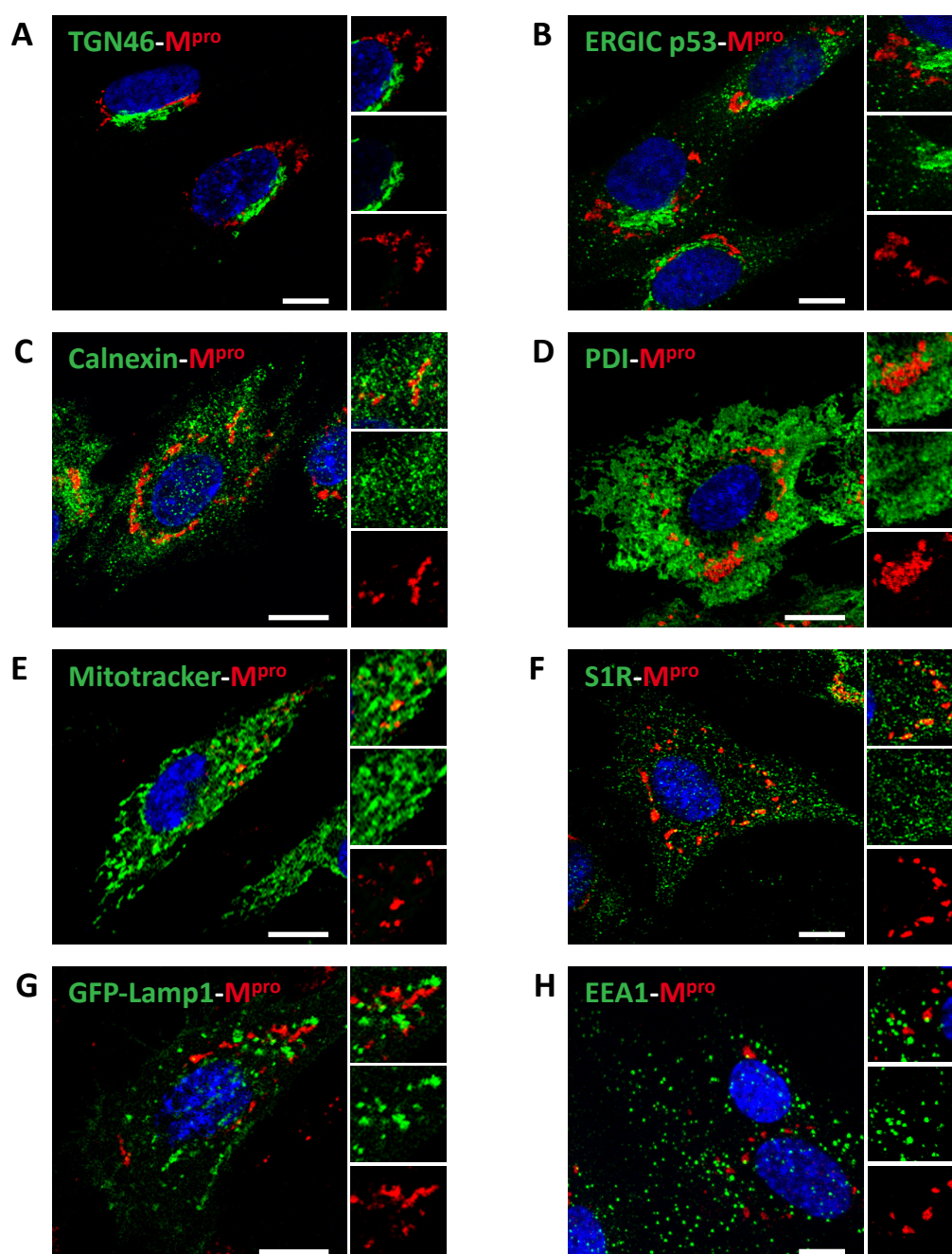
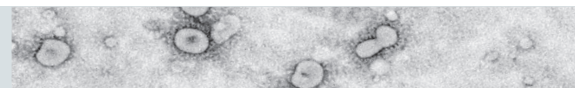


Figura 14. Origen de las membranas de las DMVs inducidas por BEV.

Ensayos de colocalización en células E.Derm infectadas con BEV y fijadas a 10 hpi empleando el anticuerpo anti-M^{pro} (rojo) como marcador de los RTCs de BEV y anticuerpos o sondas que reconocen proteínas marcadoras de orgánulos celulares (verde). Para realizar el ensayo se utilizaron: **A)** anticuerpo anti-TGN46 como proteína marcadora del Aparato de Golgi; **B)** anticuerpo anti-ERGIC p53 como proteína marcadora del compartimento intermedio; **C)** anticuerpo anti-PDI o **D)** anticuerpo anti-Calnexina como proteínas marcadoras del retículo endoplasmático; **E)** MitoTracker como marcador de mitocondrias; **F)** anticuerpo frente S1R como proteína marcadora del MAM; **G)** Expresión heteróloga de pGFP-lamp1 para marcar lisosomas; **H)** anticuerpo anti-EEA1 como proteína marcador de endosomas tempranos. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Cada panel muestra una imagen general del doble marcaje, y a su derecha una pequeña ampliación donde se muestra una región representativa del doble marcaje (panel superior) o de cada señal por separado (proteínas marcadoras de orgánulos en el panel central y la M^{pro} en el panel inferior). Barra 10 μ m.



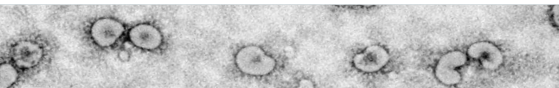
sueros. Como control se incluyeron extractos de células E.Derm infectadas o no infectadas con BEV a 16 hpi. Como se muestra en la figura 15A, los sueros anti-N y anti-M reconocen sus respectivas proteínas en Aichi, aunque este último no lo hace de forma muy eficiente. En el caso de la proteasa M^{pro}, el anticuerpo generado en rata mostró claramente dos bandas de 16 kDa y 33 kDa, ligeramente superiores a las de BEV aunque el tamaño predicho para esta proteína en ambos virus es el mismo. Sin embargo el anticuerpo generado en conejo únicamente reconoce el fragmento de 16 kDa. Sorprendentemente, a pesar de que la RdRp es una proteína muy conservada entre los torovirus, el anticuerpo anti-RdRp no reconoció la proteína de Aichi, aunque reconoce una pequeña banda entorno a 17 kDa que solo está presente en las células infectadas con este aislado. En el caso del anticuerpo anti-Hel, al igual que en BEV, no reconoce la proteína Hel de Aichi mediante inmunoblot. Aparte de los sueros descritos para BEV, se utilizó un suero frente a la proteasa PLP del torovirus bovino BRV previamente generado en el laboratorio. Este suero reconoce específicamente una proteína de unos 70 kDa de tamaño en los extractos celulares infectados con Aichi, sin embargo no muestra señal específica para BEV, algo lógico ya que el péptido sintético utilizado para producir este suero presenta baja homología de secuencia con BEV.

A continuación, los distintos sueros se ensayaron por IF utilizando células HRT-18 infectadas con Aichi y fijadas a 48 hpi (Fig. 15B). Al igual que en BEV, los sueros de la M^{pro} y la Hel mostraron una señal específica en forma de parches localizados en la región perinuclear, con una gran colocalización entre sí. Algo similar se observó con el suero anti-PLP, el cual mostró una gran especificidad, con una señal en forma

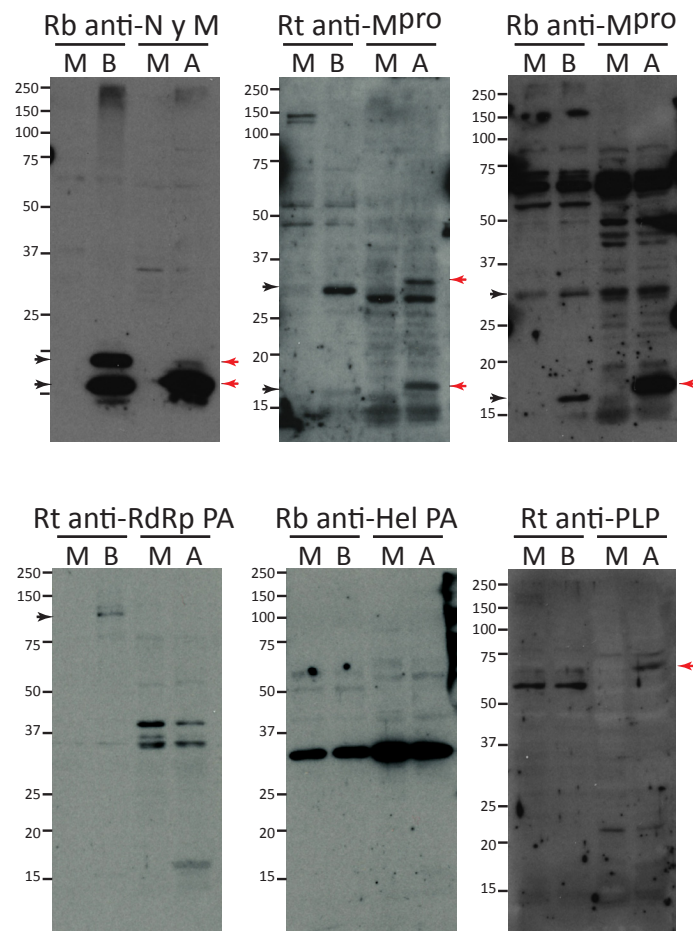
de parches que colocaliza muy bien con la señal de la M^{pro}. En paralelo se utilizó este suero en células E.Derm infectadas con BEV, comprobando nuevamente que el suero frente a la PLP de BToV no reconoce la correspondiente proteína de BEV. Por su parte, el suero anti-RdRp, al igual que en el ensayo de WB, no reconoció la RdRp de Aichi (resultados no mostrados).

Considerando los resultados de inmunofluorescencia parece razonable pensar que el torovirus bovino Aichi puede formar los RTCs de manera muy parecida a BEV. Por esta razón, decidimos analizar mediante microscopía electrónica de transmisión las células HRT-18 infectadas con Aichi. Para ello, a las 48 hpi las células fueron embebidas en resina TAAB-812 y se obtuvieron secciones ultrafinas. Como se muestra en la figura 15 C-D, el torovirus Aichi induce la formación de DMVs en las células HRT-18. Nuevamente, las DMVs observadas en las células infectadas con Aichi se localizan en áreas con gran abundancia de RE y mitocondrias que las rodean. En general, la apariencia de los grupos de DMVs se asemeja mucho a la observada en BEV, aunque el aspecto de las DMVs es más irregular y alargado. Además también se observan conexiones entre las propias DMVs (Fig. 15C2) y entre estas y el RE (Fig. 15D). Curiosamente, entre la masa de DMVs, también se observan largas membranas pareadas en continuidad con el RE, las cuales en ocasiones están conectadas con DMVs (Fig. 15D). Como se describe extensamente en el capítulo II, BEV también induce la formación de membranas pareadas.

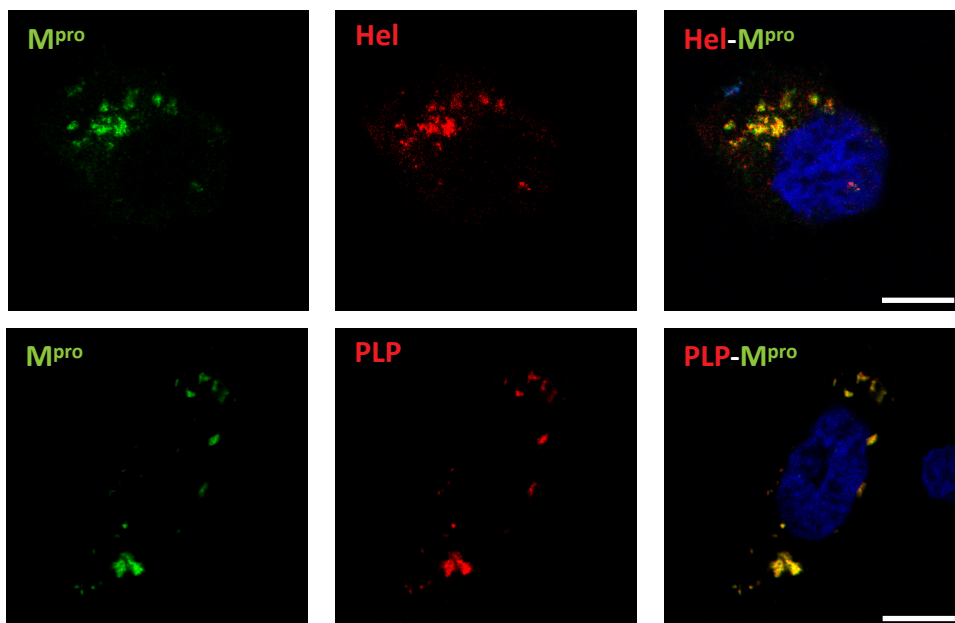
En conjunto, los resultados con el virus Aichi aportan una nueva evidencia sobre la presencia de DMVs en el citoplasma de células infectadas con un torovirus, pudiendo afirmar que la formación de DMVs es algo común dentro del género *Torovirus*.

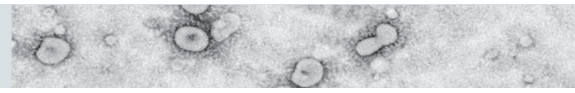


A

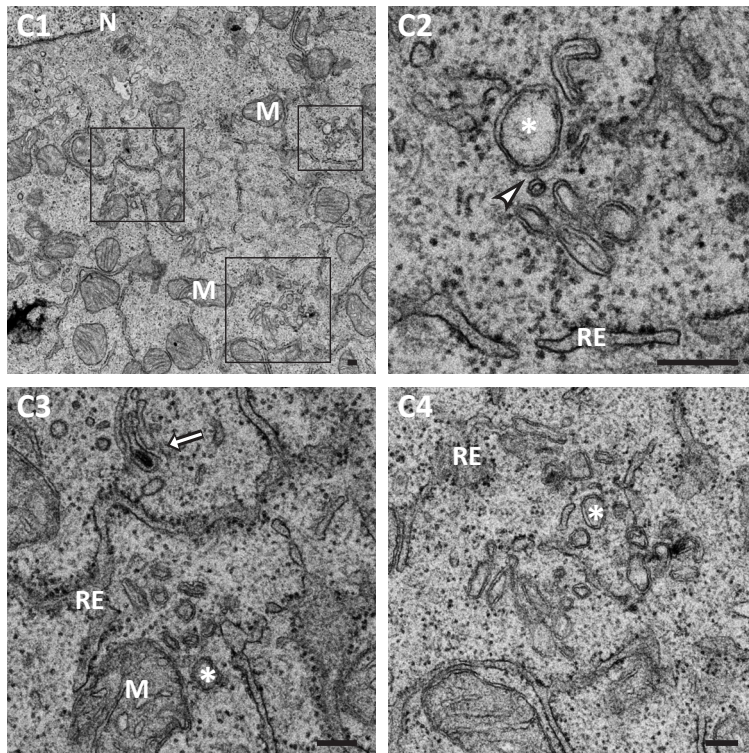


B





C



D

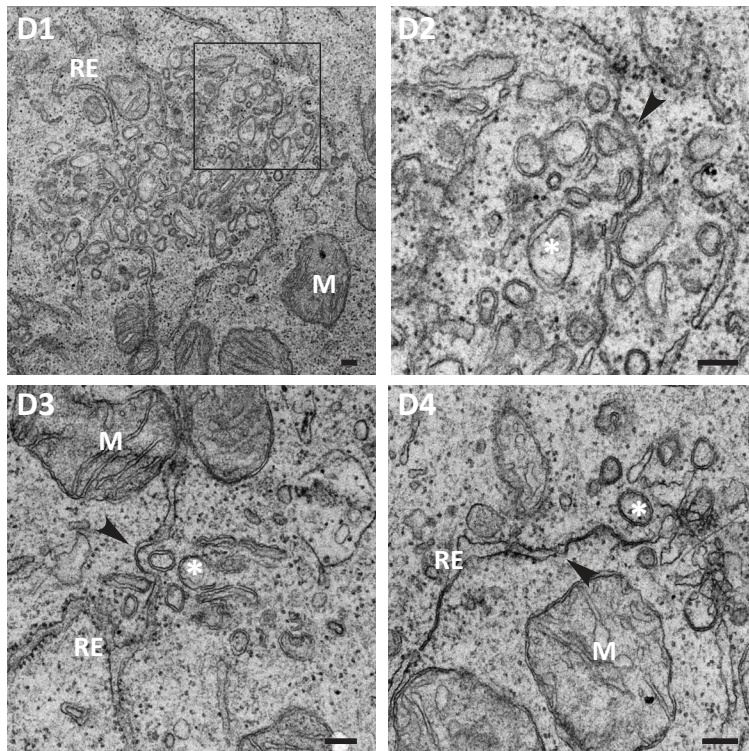


Figura 15. Caracterización de los RTCs del torovirus bovino Aichi.

A) Análisis por inmunoblot de la reactividad de los anticuerpos generados para BEV frente a las proteínas del virus Aichi. Para ello, se usaron extractos de células humanas HRT-18 no infectadas (M) o infectadas con Aichi (A) a 48 hpi. Como control se incluyeron extractos de células E.Derm no infectadas (M) o infectadas con BEV (B) a 16 hpi. Las proteínas de Aichi se detectaron utilizando los sueros anti-N, anti-M, anti-M^{pro} de conejo o rata, anti-RdRp y anti-Hel, y además se utilizó un suero específico de la proteasa PLP del torovirus bovino BRV. A la izquierda se muestra la posición y tamaño de los marcadores de peso molecular en kDa. La flecha negra indica la proteína correspondiente en los extractos de BEV y la flecha roja hace lo propio con los extractos de Aichi. **B)** Caracterización mediante microscopia confocal. Se realizaron ensayos de colocalización en células HRT-18 infectadas con Aichi durante 48 h, utilizando el anticuerpo anti-M^{pro} (verde) junto a los anticuerpos anti-Hel o anti-PLP (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra 10 µm. **C-D)** Caracterización ultraestructural. Se infectaron células HRT-18 con Aichi y a las 48 hpi fueron incluidas en resina TAAB-812 y procesadas para su análisis mediante microscopia electrónica de transmisión. C1) micrografía donde se observan tres focos de DMVs rodeados por mitocondrias y RE. C1-3) Ampliación de los tres focos de DMVs. **D)** Micrografías donde se observan largas membranas pareadas en continuidad con el RE entre la masa de DMVs. D2) representa una ampliación de D1. M mitocondria; RE retículo endoplasmático; N núcleo. Los asteriscos señalan DMVs. La flecha blanca señala partículas virales. El triángulo negro señala membranas pareadas y el triángulo blanco señala una conexión DMV-DMV. Barra 200 nm.

II. Biogénesis y estructura de las factorías de replicación producidas por BEV

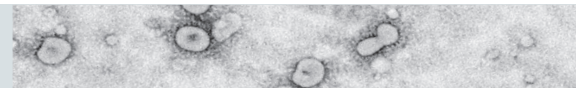
Los estudios anteriormente expuestos muestran que en las células infectadas con los torovirus BEV y Aichi existe una clara asociación entre los RTCs y las DMVs que se inducen tras la infección. Por esta razón, se decidió realizar un estudio ultraestructural mucho más completo, el cual nos permitiera conocer más a fondo la dinámica de formación y la biogénesis de estas estructuras tan importantes para la replicación del virus.

7. Estructuras membranosas inducidas por la replicación de BEV a lo largo de la infección

En primer lugar se decidió ampliar el estudio ultraestructural realizado previamente sobre secciones de células E.Derm infectadas con BEV y embebidas en resina TAAB-812. La elección de los tiempos de infección a analizar se hizo en base a la dinámica de aparición y acumulación de las proteínas no estructurales (Fig. 6A-B) o del RNA viral (Fig. 6C) en forma de dsRNA (Fig. 8) o de RNA de nueva síntesis (Fig. 10). Se decidió realizar un estudio ultraestructural a los tiempos de 6, 10 y 16 hpi que cubriera las distintas etapas del proceso de replicación, con un tiempo temprano como es 6 hpi en el que los RTC comienzan a formarse, presentando niveles de nsps y RNA viral aún bajos, un tiempo intermedio de 10 hpi donde la replicación está a pleno rendimiento, con niveles muy considerables de nsps y una gran síntesis de RNA viral, y un tiempo más tardío de 16 hpi, donde la acumulación de proteínas es muy alta pero la síntesis de RNA está finalizando.

A primera vista se observan diferencias considerables entre los distintos tiempos analizados. En primer lugar se observa un claro incremento en el número de DMVs presentes en las células infectadas a medida que avanza la infección (Fig. 16). Una segunda característica muy aparente es su localización, a tiempos tempranos las DMVs se localizan dispersas por el citoplasma formando pequeños grupos o focos con un número reducido de DMVs, sin embargo, conforme avanza la infección, a 10 hpi y aún más evidente a 16 hpi, esos focos tienden a estar localizados cerca de la región perinuclear. A estos tiempos los focos de DMVs están formados por un gran número de DMVs y muestran una gran complejidad. Ambas características fueron previamente descritas al estudiar la distribución de las nsps a lo largo de la infección por inmunofluorescencia (Fig. 6A), donde de manera similar se observó una evolución desde pequeños puntos o focos dispersos por el citoplasma a tiempos tempranos de infección, a grandes masas o parches de proteínas en la región perinuclear a tiempos tardíos de infección.

Otra característica que se aprecia a medida que transcurre la infección, es una aparente disminución en el diámetro de las DMVs. Aunque las DMVs presentan un tamaño bastante heterogéneo, a simple vista da la sensación de que el número de vesículas pequeñas se incrementa con el transcurso de la infección. Para confirmar esta apreciación se hizo una cuantificación del diámetro interno de las DMVs ($n=100$) a cada tiempo, obteniéndose un valor medio de 153 ± 53 nm para 6 hpi, 111 ± 36 nm para 10 hpi y 68 ± 26 nm para 16 hpi. Dada la gran variabilidad existente en el diámetro de las DMVs dentro de un mismo tiempo, se representó su valor en forma de mediana indicando el valor máximo y mínimo obtenido (Fig. 16B). Los valores indican claramente que el diámetro de las DMVs tiende a ser menor a medida que avanza la infección. No obstante, una disminución en el diámetro medio de las DMVs no indica directamente que las DMVs



previamente formadas a tiempos tempranos reducen su volumen, ya que a 16 hpi también se observan DMVs con diámetros entre 150-200 nm, solo que su proporción con respecto a las DMVs de menor tamaño es muy inferior. Aunque no se puede descartar ninguna hipótesis, la presencia de DMVs grandes a tiempos tardíos indicaría más bien que a medida que avanza la infección, las DMVs de nueva formación tienen un volumen más pequeño.

Al examinar los grupos de DMVs con más detalle (Fig. 17) se observan las características previamente descritas y mostradas en la figura 3, donde muchas DMVs están conectadas entre sí por su membrana externa, y en ciertas ocasiones estas membranas presentan continuidad con el RE. Estudios tridimensionales relativamente recientes realizados en SARS-CoV y EAV, han mostrado que las factorías de replicación de estos virus consisten en una red de membranas modificadas procedentes del RE (Knoops y col., 2008; Knoops y col., 2012). En nuestro caso, las distintas conexiones que se observan tras la infección con BEV podrían indicar que las DMVs de BEV también pueden formar parte de una red reticulovesicular. Esta red fue mucho más evidente a 6 hpi debido a la mayor sencillez de sus estructuras, mostrando grupos de DMVs, generalmente compuestos por cuatro o cinco DMVs, conectadas entre sí y con conexión con el RE (Fig. 17). Curiosamente, se observa la presencia de pequeñas vesículas en el interior de algunas DMVs, las cuales por su posición y forma podrían corresponder con la propia conexión con las DMVs adyacentes. A tiempos más tardíos las conexiones con el RE son menos evidentes, aunque se siguen visualizando en la periferia de la red.

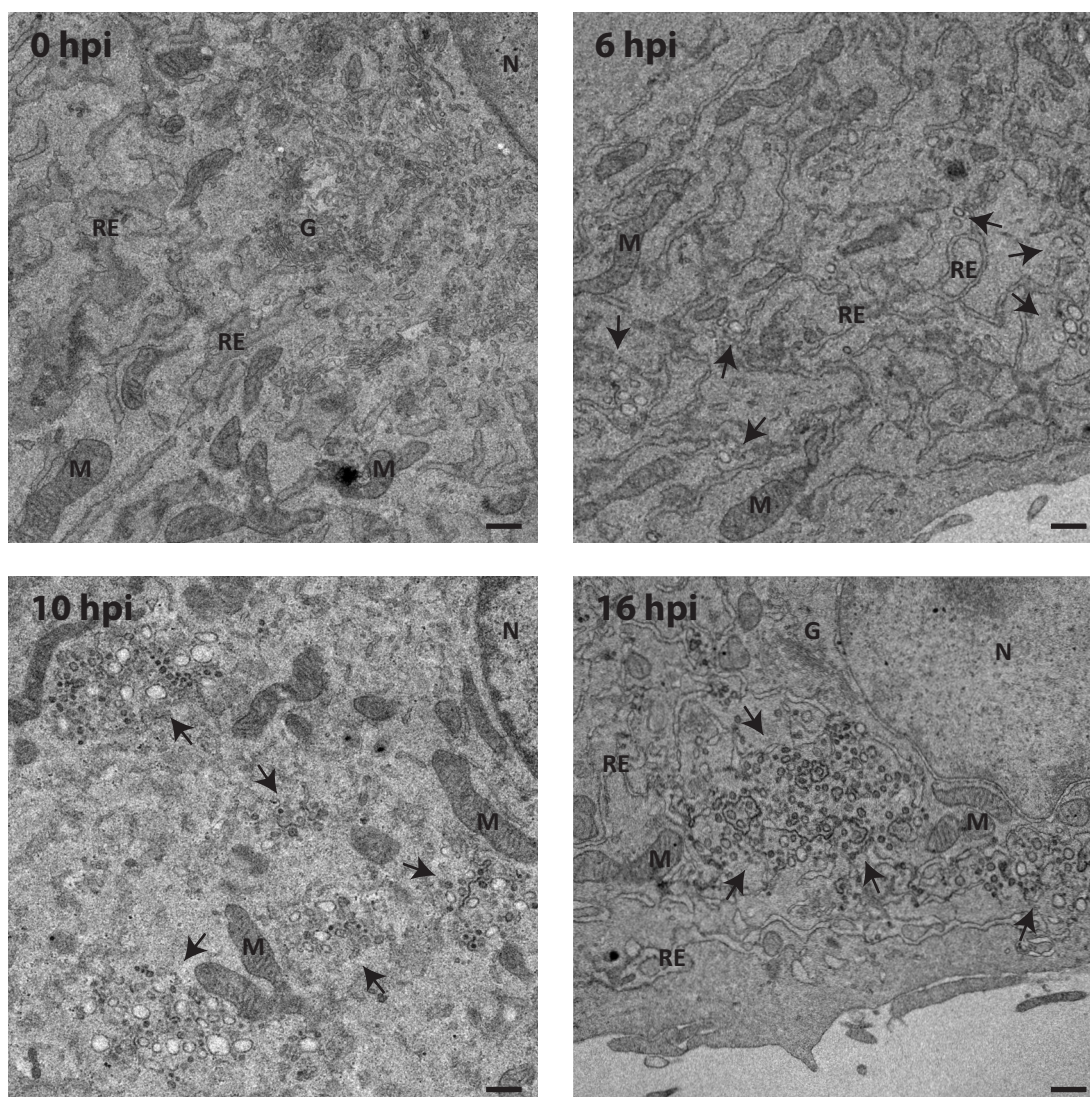
La característica maraña de membranas retorcidas o CM encontradas en continuidad con las DMVs inducidas por los coronavirus SARS-CoV, MERS-CoV y MHV (de Wilde y col., 2013; Ulasli y col., 2010; Knoops y col., 2008), y que corresponde con el lugar donde principalmente se localizan las nsps de estos virus, no se observa en la red

inducida por BEV. Sin embargo, si se observan largas membranas pareadas con gran parecido a la doble membrana de las DMVs. Las membranas pareadas se observan desde las 6 hpi aunque su presencia se hace más aparente a medida que avanza la infección, y adquieren un aspecto mucho más sinuoso. Curiosamente, a tiempos tardíos de infección se observan invaginaciones de las membranas pareadas, las cuales tienen el aspecto de DMVs abiertas al citoplasma. Estas invaginaciones guardan un cierto parecido con las esférulas recientemente descritas para IBV (Maier y col., 2013b), en las que se observa un claro canal que conecta su interior con el citoplasma de la célula. La presencia de esférulas en IBV ha despertado un gran interés puesto que existe una gran controversia sobre el mecanismo por el cual el RNA viral producido tras la replicación, supuestamente en el interior de las DMVs, es capaz de salir al citoplasma. Dado que las esférulas podrían cumplir ese papel, es importante asegurar la verdadera presencia de esférulas bajo la infección con BEV.

8. Estudio tridimensional de las factorías de replicación inducidas por BEV

A la vista de los resultados anteriores, se hace necesaria la aplicación de estudios tridimensionales que permitan resolver si la infección con BEV realmente induce la formación de una red reticulovesicular con conexiones entre los distintos componentes descritos hasta ahora, como son las DMVs, las membranas pareadas y las esférulas. Además, es importante confirmar o descartar la presencia de estas últimas estructuras en las células infectadas por BEV. Aunque aparentemente las esférulas observadas durante la infección con BEV tienen la forma correcta, sin estudios tridimensionales (3D) que lo avalen, no podemos descartar la posibilidad de que únicamente sean estructuras curvadas formadas a partir de las membranas pareadas.

A



B

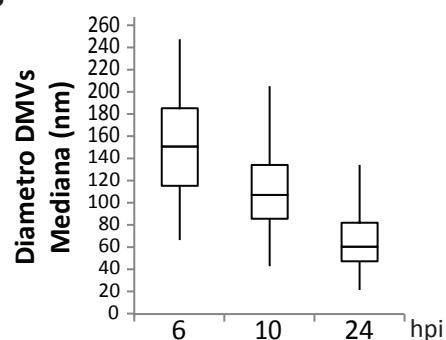


Figura 16. Análisis ultraestructural de las factorías de replicación inducidas por BEV a lo largo de la infección.

Micrografías de células E.Derm no infectadas (0 hpi) o infectadas con BEV a 6 hpi, 10 hpi y 16 hpi, y embebidas en resina TAAB-812. **A)** Micrografías tomadas a baja magnificación. Las flechas indican la presencia de grupos de DMVs. Barra 1 µm. **B)** Cuantificación del diámetro interno de las DMVs (n=100). En el gráfico se representan las medianas de los valores obtenidos, mostrándose además los valores de los cuartiles Q3 y Q1, así como los valores máximo y mínimo.

8.1 Estudio 3D utilizando cortes seriados

Como primera aproximación nos planteamos un estudio 3D de las factorías de

replicación inducidas por BEV empleando cortes seriados. Para ello, monocapas de células E.Derm infectadas a 6, 10 y 16 hpi, fueron directamente embebidas en resina TAAB-812 y posteriormente

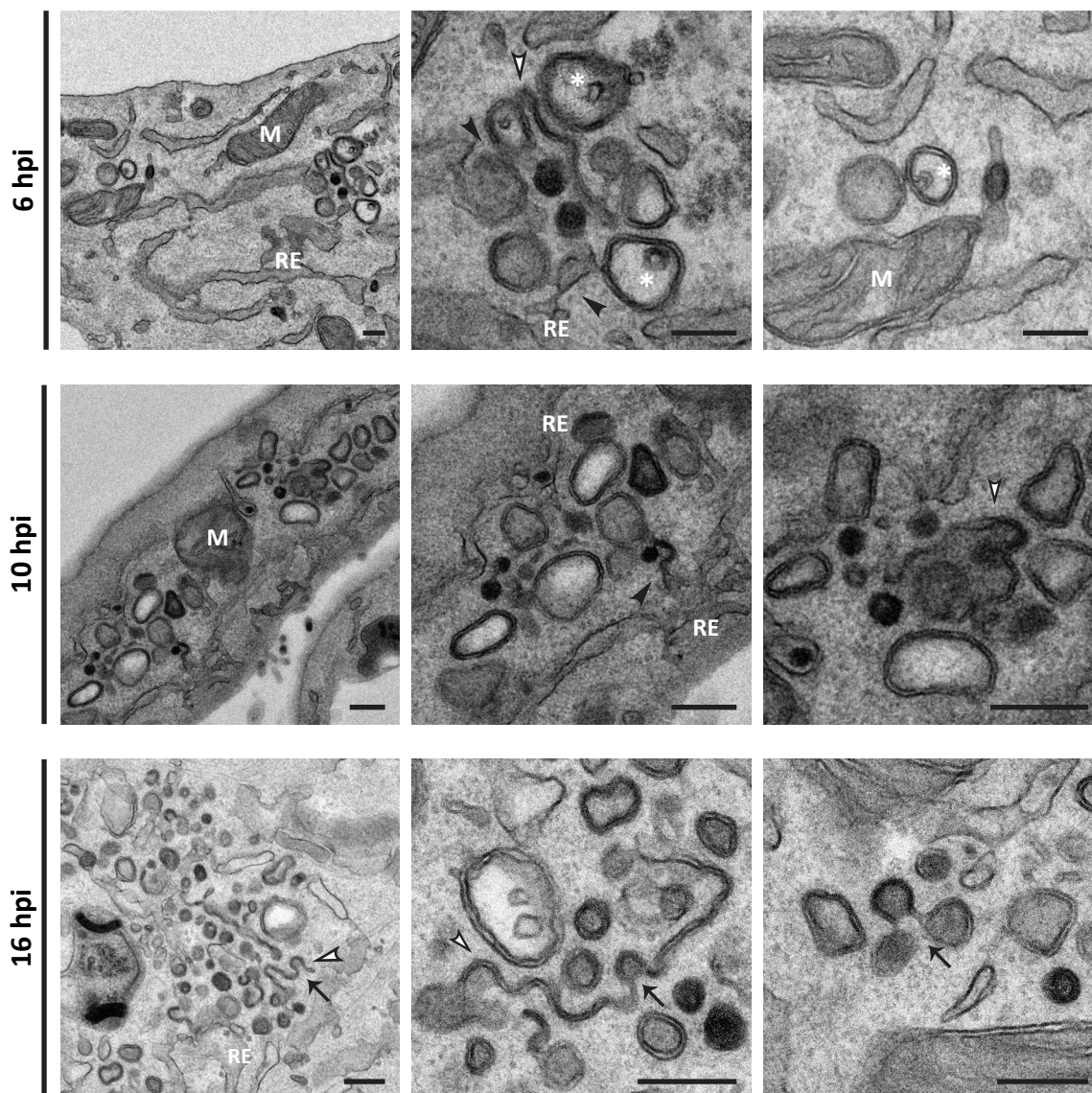


Figura 17. Estructuras membranosas relacionadas con las DMVs generadas a largo de la infección con BEV.

Micrografías de células E.Derm infectadas con BEV a 6 hpi, 10 hpi y 16 hpi, y embebidas en resina TAAB 812. En los ejemplos mostrados a todos los tiempos se observan DMVs conectadas entre sí y con conexión con el RE (triángulo negro), así como la presencia de membranas pareadas entre la masa de DMVs (triángulo blanco). También se observan invaginaciones a modo de esférulas (flecha) a 16 hpi. El asterisco representa pequeñas vesículas en el interior de las DMV. M: mitocondria; RE: retículo endoplásmico. Barra 200 nm.

fueron procesadas para su análisis mediante microscopía electrónica de transmisión.

En primer lugar se hicieron cortes seriados de las células infectadas a 6 y 10 hpi con un grosor aproximado de 70 nm, comenzando desde la parte más basal de la monocapa de células, y subiendo hacia la zona apical. En la figura 18 se muestra una serie de cuatro cortes seriados a cada uno de estos tiempos, en los que nuevamente podemos

observar conexiones entre las propias DMVs y el RE, así como membranas pareadas y esférulas a 10 hpi. Además, visualmente se puede apreciar la diferencia existente en el diámetro de las DMVs entre las 6 y las 10 hpi, donde claramente el porcentaje de vesículas de menor tamaño frente a las de mayor tamaño se incrementa con el tiempo. Precisamente, debido al relativamente pequeño tamaño mostrado por las DMVs,

los cortes seriados de 70 nm no pudieron ser utilizados para llevar a cabo una reconstrucción 3D. Como se ilustra en la figura 18, y teniendo en cuenta que el diámetro máximo de una DMV fue de 250 nm (Fig. 16B), cada DMV se puede seguir únicamente en tres cortes consecutivos de 70 nm, haciendo prácticamente imposible el hacer una reconstrucción 3D. Esto se dificulta todavía más a 10 hpi, donde como ya habíamos mencionado, por regla general las DMVs tienen un diámetro menor.

Ante esta situación se procedió a hacer nuevos cortes seriados reduciendo el grosor de los mismos hasta aproximadamente 50 nm. Debido a que el objetivo principal del estudio era discernir si las estructuras inducidas por BEV forman parte de una red reticulovesicular, se decidió iniciar los análisis por las muestras de 6 hpi, tiempo en el que la complejidad de la red es menor, y donde la garantía de poder llevar a cabo una reconstrucción 3D es mayor debido al mayor diámetro de las DMVs. La figura 19 muestra una serie de doce imágenes capturadas en secciones consecutivas donde, una vez alineadas las imágenes, se puede observar que las DMVs de mayor tamaño abarcan 5 o 6 secciones. Examinando detalladamente la serie podemos observar que la gran mayoría de las DMVs presentan conexiones en algún punto de la misma con el RE o con la membrana pareada que se deriva de este, así como conexiones entre sí, mostrando claramente que todas las estructuras están unidas formando una red (Video 2). Otra característica muy evidente es el colapso de las membranas del RE para dar lugar a la membrana pareada. Como se puede observar en la figura 19, las membranas pareadas no son estructuras tubulares sino más bien grandes láminas en continuidad con el RE, con forma irregular, presentando diversos pliegues o curvaturas a lo largo de la misma.

Dado que parece claro que las membranas pareadas derivan del RE, y que estas muestran conexiones con las DMVs, no es desacertado pensar que BEV induce una red de DMVs derivadas del RE o una red reticulovesicular para llevar a cabo

su replicación.

Para ilustrar la red se realizó una reconstrucción 3D utilizando las imágenes mostradas en la figura 19. En la representación 3D se observa que todo forma parte de una red, aunque tiene una apariencia muy artificial a consecuencia de la falta de información que existe entre corte y corte (Datos no mostrados).

Con el objetivo de confirmar la presencia de esférulas en las células infectadas por BEV se realizaron cortes seriados de 50 nm a 16 hpi. Como muestra la figura 20, el pequeño tamaño de estas estructuras no nos permite hacer un seguimiento de las esférulas entre los cortes. A este tiempo queda patente la gran complejidad de la red reticulovesicular donde las membranas pareadas presentan grandes curvaturas formando una gran maraña de membranas dobles.

8.2 Estudio 3D utilizando tomografía electrónica

Ante la imposibilidad de poder discernir si BEV induce la formación de esférulas mediante los análisis anteriores, se decidió ampliar los estudios 3D aplicando tomografía electrónica. Para ello, se obtuvieron secciones de aproximadamente 300 nm de grosor a partir de monocapas de células E.Derm infectadas a 6, 10 y 16 hpi, previamente incluidas para los análisis con cortes seriados. En las figuras 21, 22 y 23 se muestran ejemplos representativos para 6 hpi, 10 hpi y 16 hpi respectivamente, donde se enseñan imágenes características de la serie tomográfica una vez alineada, así como una ampliación de la región de interés del tomograma y la reconstrucción 3D de la misma. Los tres modelos tridimensionales generados a 6, 10 y 16 hpi (Ver video 3-8), confirman la formación de una red reticulovesicular donde las DMVs y el resto de estructuras están conectados entre sí a través de membranas pareadas procedentes del RE o, al menos, en continuidad con él. Además, la estructura de las membranas pareadas también se confirma, observando grandes láminas o paredes de membranas dobles a lo largo del tomograma.

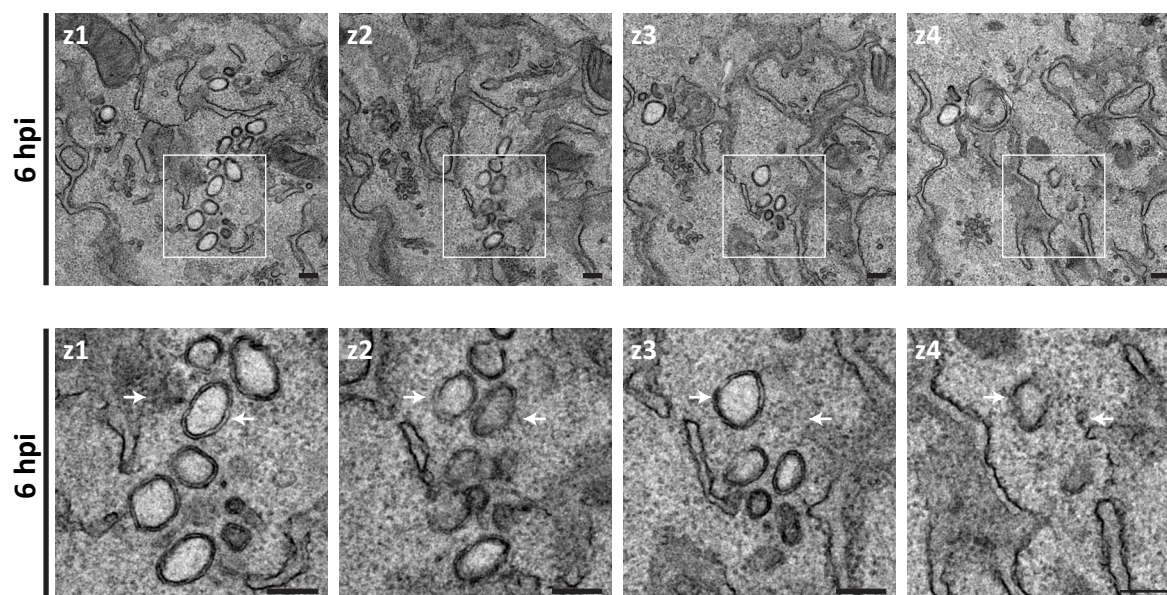
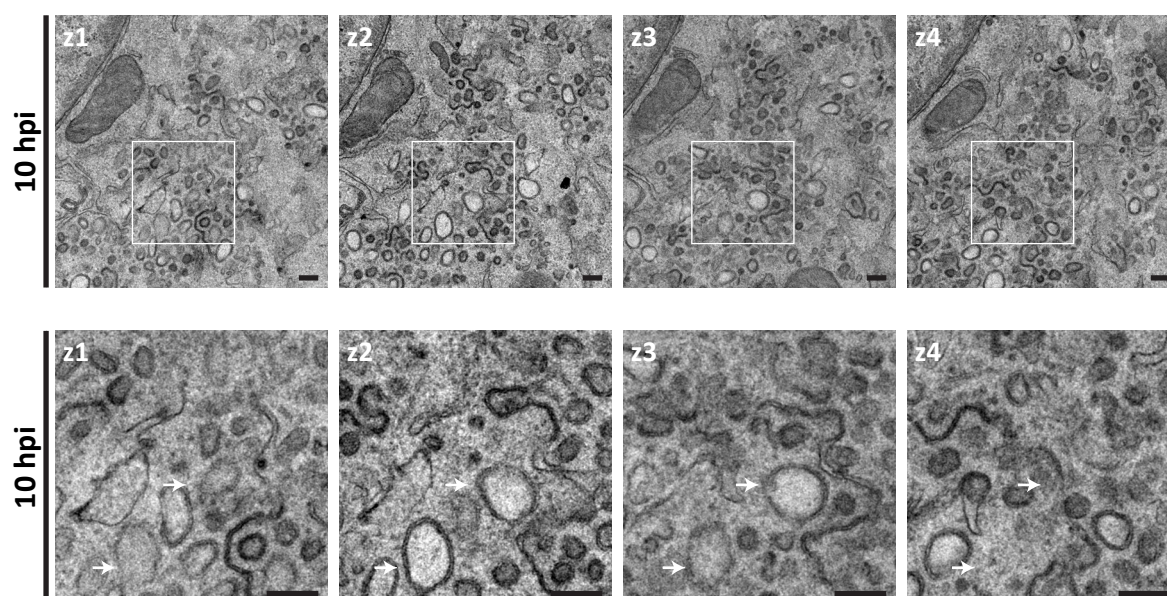
A**B**

Figura 18: Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 6 y 10 hpi utilizando cortes seriados de 70 nm de grosor.

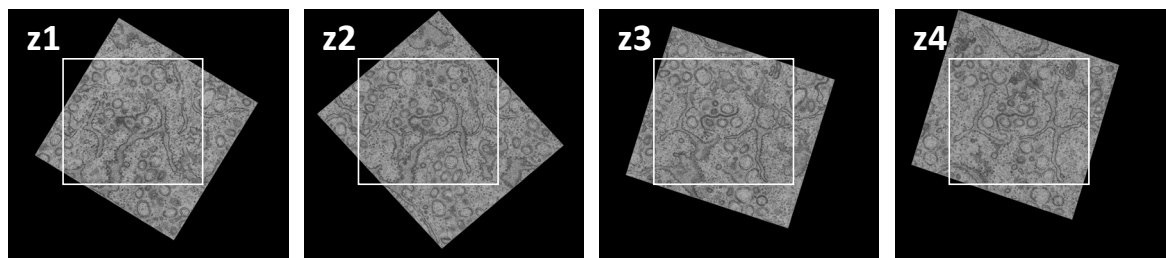
Para estos ensayos monocapas de células E.Derm infectadas a 6 y 10 hpi fueron directamente embebidas en resina TAAB 812 y procesadas para llevar a cabo ensayos de microscopía electrónica de transmisión. Se generaron cortes seriados de 70 nm de las células, desde la zona basal hacia la apical. Se muestra un ejemplo de 4 cortes consecutivos correspondientes a células infectadas durante: **A)** 6 h y **B)** 10 h. A cada tiempo se muestra una región representativa ampliada (panel inferior) indicada con un cuadrado en el panel superior. Las flechas indican el seguimiento de una DMV entre los cortes. Barras 200 nm.

Sin embargo, las conexiones entre DMVs, o entre las membranas pareadas y las DMVs, suelen ser conexiones puntuales con forma tubular.

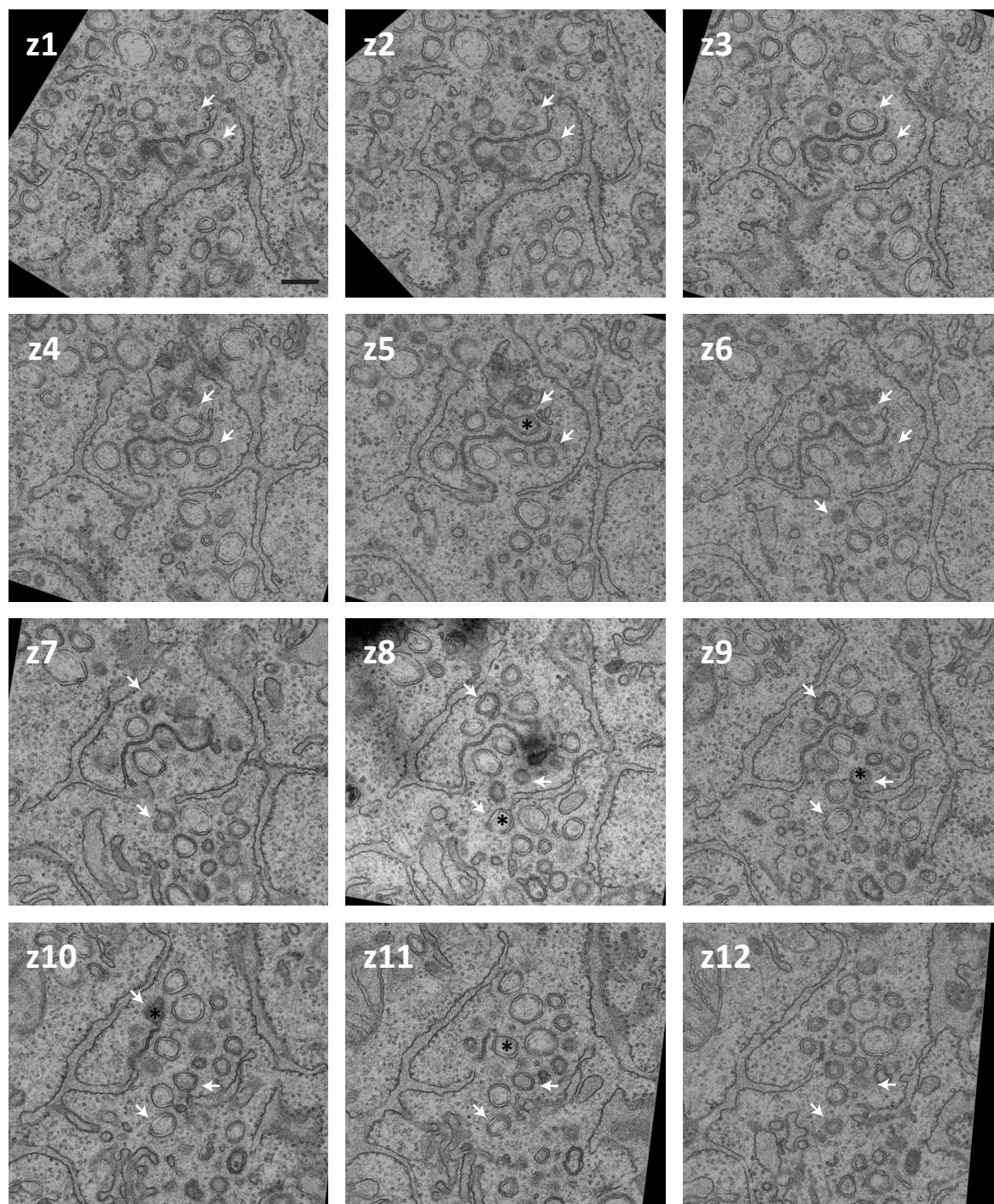
En la figura 21 correspondiente a 6 hpi se ilustra un ejemplo en el que dos DMVs presentan

conexiones tubulares con una lámina de membrana pareada, concretamente presentan conexiones con invaginaciones a modo de esférulas procedentes de esta. Aunque en algunas secciones (Fig. 21B) se observan estas membranas con forma de

A



B



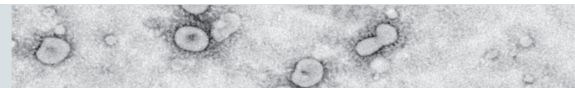


Figura 19: Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 6 hpi utilizando cortes seriados de 50 nm de grosor.

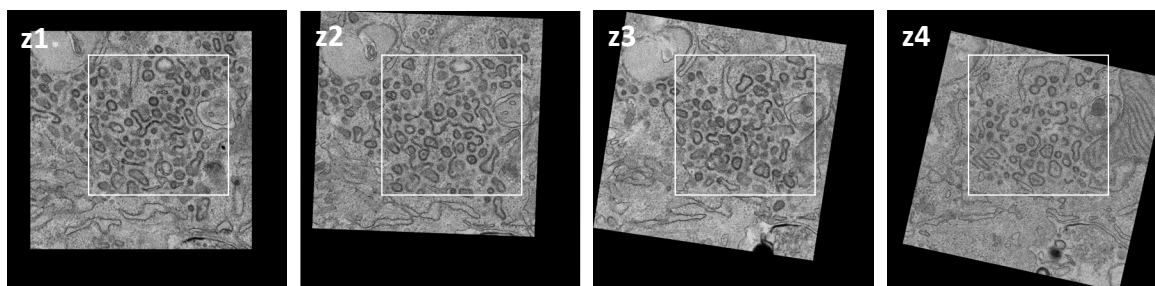
Para estos ensayos se utilizaron células E.Derm infectadas que fueron procesadas a 6 hpi tal como se describe en la leyenda de la figura 18, obteniéndose en este caso secciones de 50 nm de grosor. **A)** Alineamiento de una serie de micrografías capturadas a partir de cortes consecutivos. Como ejemplo se muestran 4 micrografías consecutivas (z1-z4) de una serie mucho más amplia. **B)** Muestra una zona seleccionada (correspondiente a los recuadros en A)) a mayor magnificación en 12 cortes consecutivos (z1-z12). Las flechas permiten el seguimiento de una DMV entre los cortes, indicando con asteriscos conexiones puntuales con el RE o la membrana pareada que se deriva de este. Barra 200 nm.

esférulas, al hacer la reconstrucción 3D (Fig. 21C) se comprueba que no son verdaderas esférulas, sino más bien invaginaciones incompletas de las membranas pareadas. Estas invaginaciones muestran un gran parecido con las DMVs, pudiendo ser un paso intermedio en la formación de estas. A diferencia de las esférulas incompletas, las dos DMVs mostradas en la representación 3D carecen de uno o de ambos extremos debido a que por su gran tamaño, de alrededor de 200 nm de diámetro, no están completas en el corte tomografiado, pero con casi total seguridad corresponden a estructuras cerradas, tal y como se observa en otras DMVs del

tomograma.

El tomograma de 10 hpi (Fig. 22) no muestra grandes diferencias con respecto al de 6 hpi, tratándose de un estado intermedio donde el número de DMVs y membranas pareadas se incrementa con respecto al tiempo anterior, pero sin grandes cambios morfológicos. En el modelo 3D se observa una región de la red reticulovesicular inducida por BEV a este tiempo, mostrando dos DMVs que presentan conexiones en forma de tubo con una pared de membrana pareada, así como una tercera DMV unida a la misma pared, pero con una conexión algo más prolongada en

A



B

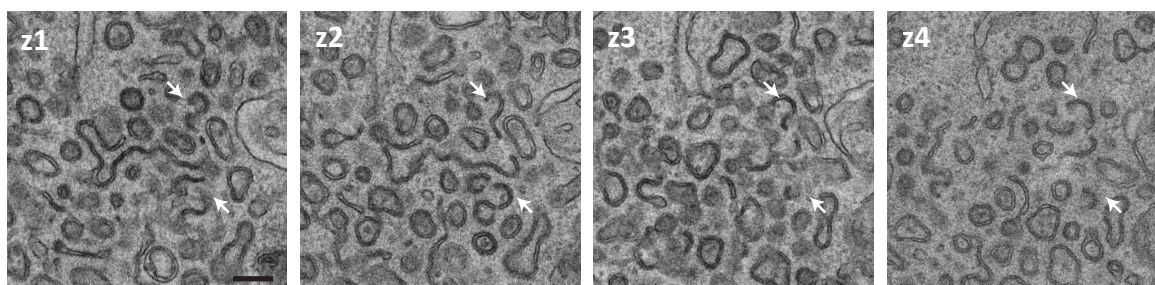


Figura 20: Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 16 hpi utilizando cortes seriados de 50 nm de grosor.

Para estos ensayos se utilizaron células E.Derm infectadas que fueron procesadas a 16 hpi tal como se describe en la leyenda de la figura 18, obteniéndose en este caso secciones de 50 nm de grosor. **A)** Alineamiento de una serie de micrografías capturadas en cortes consecutivos. Como ejemplo se muestran 4 micrografías consecutivas (z1-z4). **B)** Muestra una zona seleccionada (correspondiente a los recuadros en A)) a mayor magnificación. Las flechas indican el seguimiento de una posible esférula entre los cortes. Barra 200 nm.

el eje z. Esta última conexión, aunque es menos frecuente, también puede ser observada en el resto de tomogramas. Aunque no se representa ninguna esférula en el modelo 3D, en el resto de tomogramas a este tiempo también se observan esférulas incompletas similares a las observadas a 6 hpi. Algo curioso que se observa en la sección z5 de la figura 22B, es la presencia de una DMV con una conexión entre el interior de la DMV y el lumen de la membrana pareada. Dada la gran importancia que podría suponer este hallazgo se observó minuciosamente el resto de conexiones presentes en estos tomogramas, así como los generados a 6 y 16 hpi, no observando en ninguno de los casos este tipo de estructura. En todos los casos, las conexiones observadas se producen entre la membrana externa de la DMVs y la membrana pareada, mostrando una estructura en forma de raqueta de tenis, tal y como se observa en los ejemplos de la figura 24.

Sin embargo, los tomogramas de 16 hpi (Fig. 23) muestran una red mucho más compleja, con una gran maraña de membranas pareadas que presentan conexiones con las DMVs y las esférulas. A estos tiempos la calidad de imagen de los tomogramas obtenidos fue algo más pobre, achacable probablemente al propio estado avanzado de infección. No obstante, se pueden distinguir bien membranas pareadas con invaginaciones a modo de esférulas, que fueron las regiones elegidas para llevar a cabo la reconstrucción 3D. Como se muestra en la figura 23, en la representación 3D se pueden observar algunas esférulas incompletas en continuidad con una lámina de membrana pareada. A este tiempo las membranas pareadas muestran un aspecto mucho más curvado que a tiempos anteriores. Claramente las esférulas observadas a 16 hpi, al igual que aquellas observadas a tiempos más tempranos, corresponden con una invaginación incompleta de la propia membrana pareada a la que están unidas, manteniendo una apariencia que recuerda más a una DMV en posible formación que a las esférulas descritas para IBV.

Ante la aparente inexistencia de verdaderas esférulas, se suscita una gran cuestión aún sin resolver, como es la ausencia de poros o canales que conecten el interior de las DMVs con el citoplasma. Si asumimos que en las DMVs inducidas por BEV ocurre la replicación, es imprescindible que exista un canal que permita la salida del RNA recién formado. En alusión a esto, en algunas DMVs de los tomogramas de 6 hpi se observó la presencia de una estructura que recuerda mucho a un poro, concretamente se observó una discontinuidad puntual en la membrana de la DMVs en forma de unión entre la membrana externa y la membrana interna. La figura 25A muestra un ejemplo donde se puede observar la aparición de la estructura descrita (Fig. 25A z2) en una serie de cuatro secciones capturadas del tomograma. En la figura 25B se muestran otros ejemplos de posibles poros observados en el resto de tomogramas de 6 hpi. A 10 hpi también se observa algún ejemplo, aunque estos son menos claros debido a la peor resolución del tomograma. Sin embargo, una visualización más precisa de estos poros en los distintos ejes del tomograma no permite apreciar con claridad si realmente existe continuidad entre el interior de la DMV y el citoplasma. Para tratar de resolver este problema se seleccionaron las distintas imágenes de DMVs con poros y se hizo un alineamiento con el objetivo de ver si existe consenso en la estructura, pero dada la gran variabilidad existente entre las membranas de estas estructuras no se logró obtener una estructura consenso del poro. Aunque queda patente que en estos puntos hay una unión entre la membrana externa y la interna de las DMVs no queda lo suficientemente probado que realmente estas estructuras sean poros como tal.

En general, los estudios 3D indican que BEV induce toda una red de vesículas de doble membrana unidas entre sí por membranas pareadas procedentes del RE. Además estas estructuras se hacen más grandes y complejas a medida que avanza la infección. Aunque no existe un claro mecanismo de formación de la

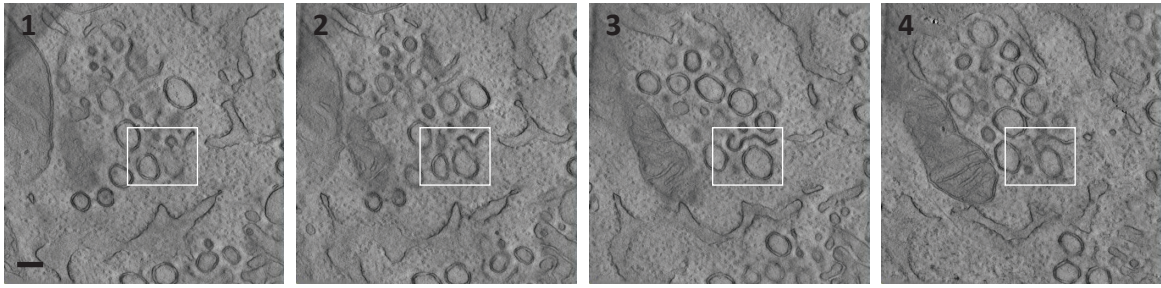
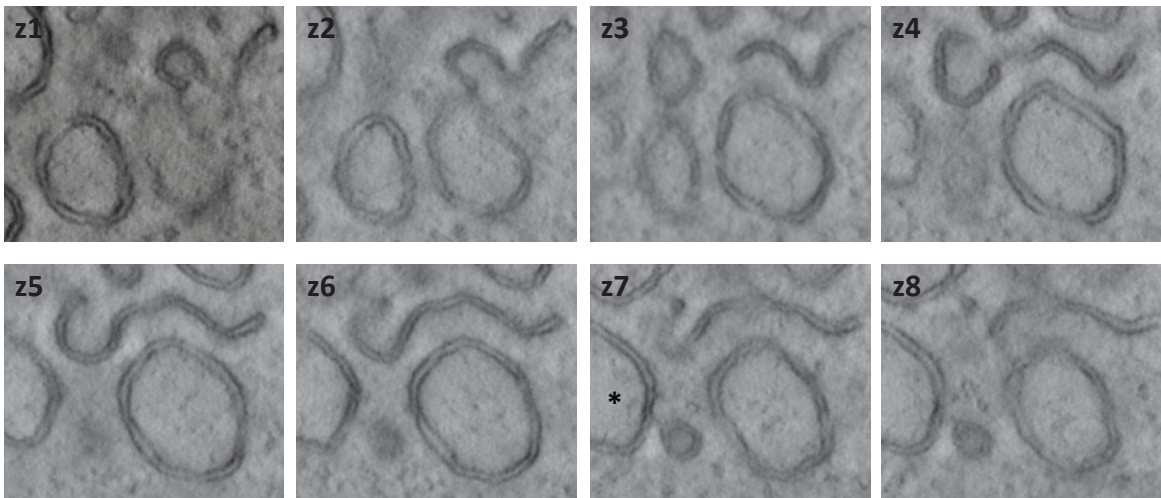
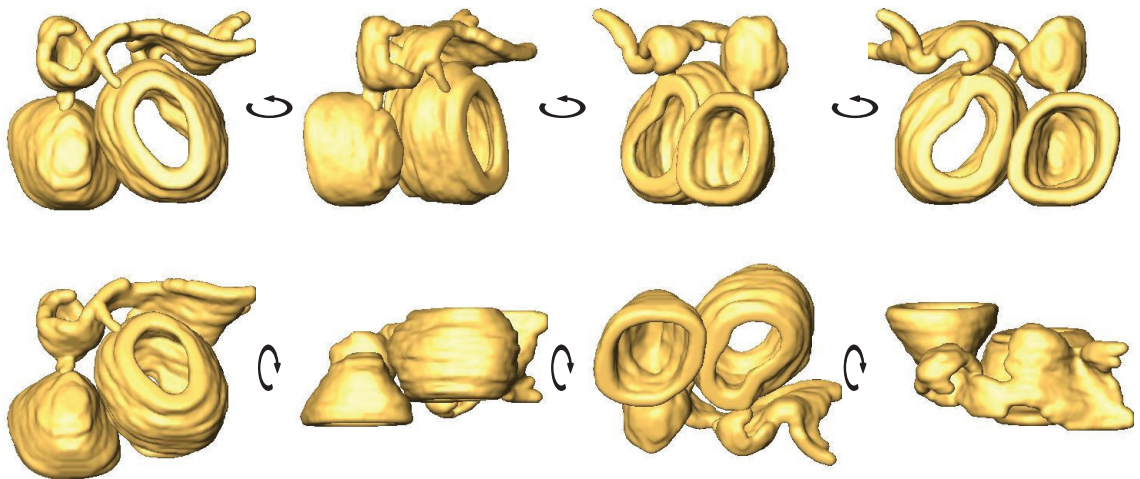
A**B****C**

Figura 21: Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 6 hpi utilizando tomografía.

Para llevar a cabo los ensayos de tomografía se utilizaron secciones de aproximadamente 300 nm de grosor generadas a partir de monocapas de células E.Derm infectadas a 6 hpi. **A)** Imágenes representativas del tomograma una vez alineado. El cuadrado representa la región ampliada en B) y usada para generar la reconstrucción 3D mostrada en C). **B)** Secciones del tomograma capturadas cada 20 nm siguiendo el eje z. El asterisco indica una DMV no reconstruida. **C)** Reconstrucción 3D mostrada en diferentes orientaciones, siguiendo un giro de izquierda a derecha en el panel superior, y de arriba abajo en el panel inferior. Barra 200 nm.

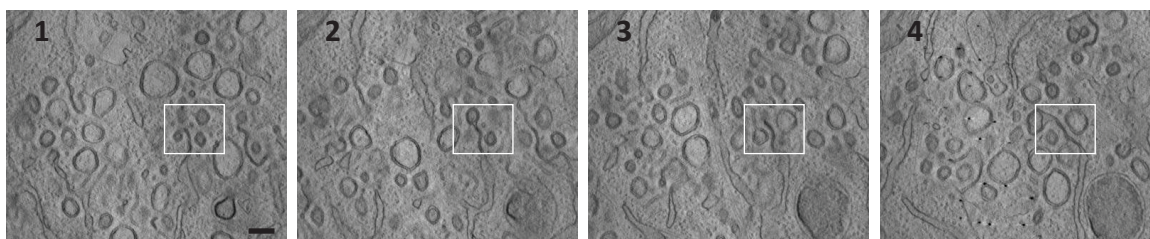
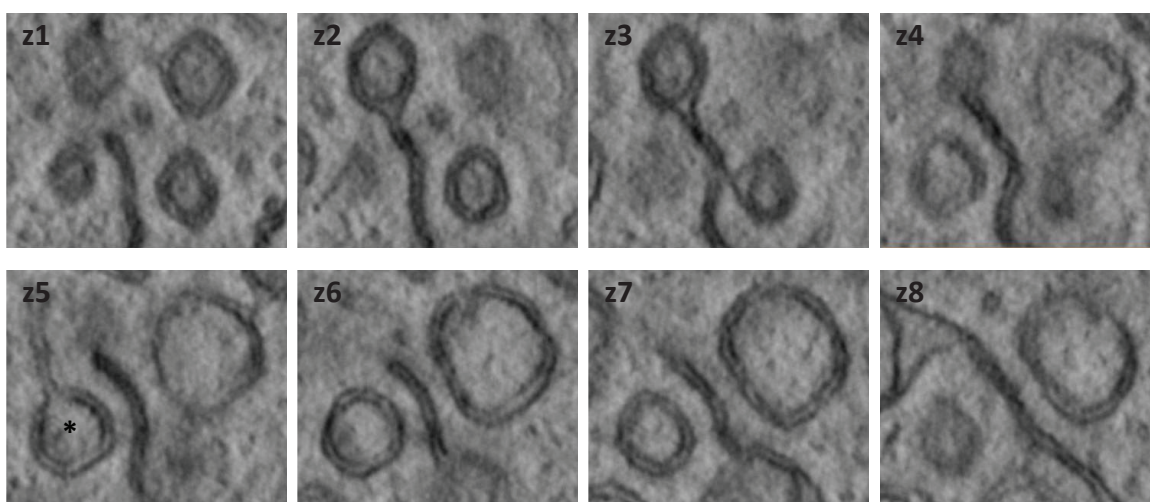
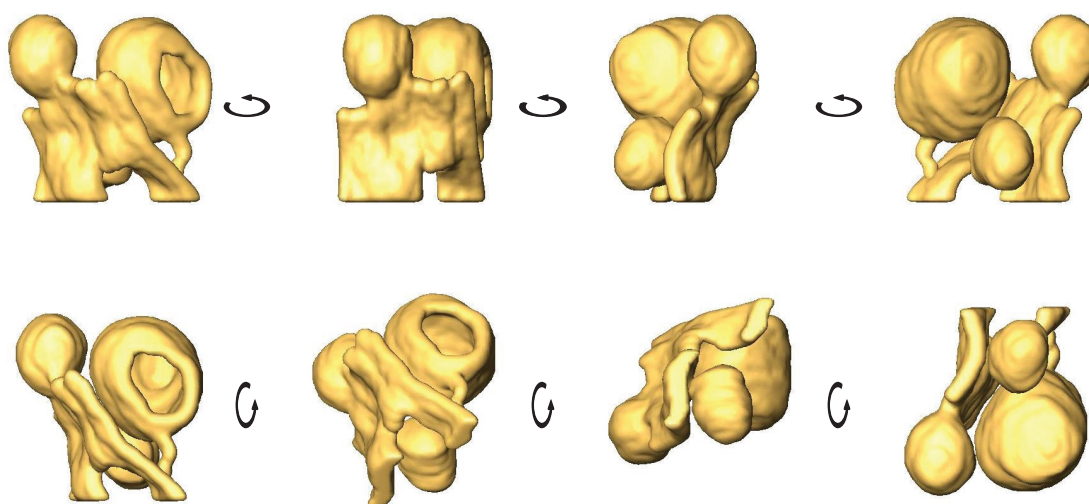
A**B****C**

Figura 22: Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 10 hpi utilizando tomografía.

Para llevar a cabo los ensayos de tomografía se utilizaron secciones de aproximadamente 300 nm de grosor generadas a partir de monocapas de células E.Derm infectadas a 10 hpi. **A)** Imágenes representativas del tomograma una vez alineado. El cuadrado representa la región ampliada en B) y usada para generar la reconstrucción 3D mostrada en C). **B)** Secciones del tomograma capturadas cada 16 nm siguiendo el eje z. El asterisco indica una DMV no reconstruida. **C)** Reconstrucción 3D mostrada en diferentes orientaciones, siguiendo un giro de izquierda a derecha en el panel superior, y de arriba abajo en el panel inferior. Barra 200 nm.

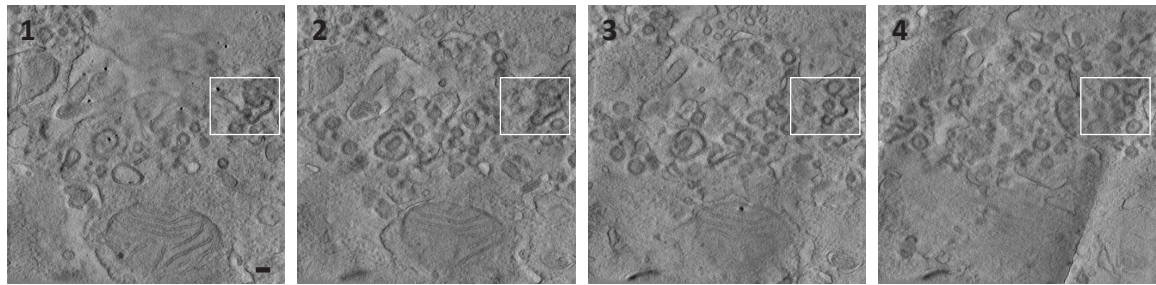
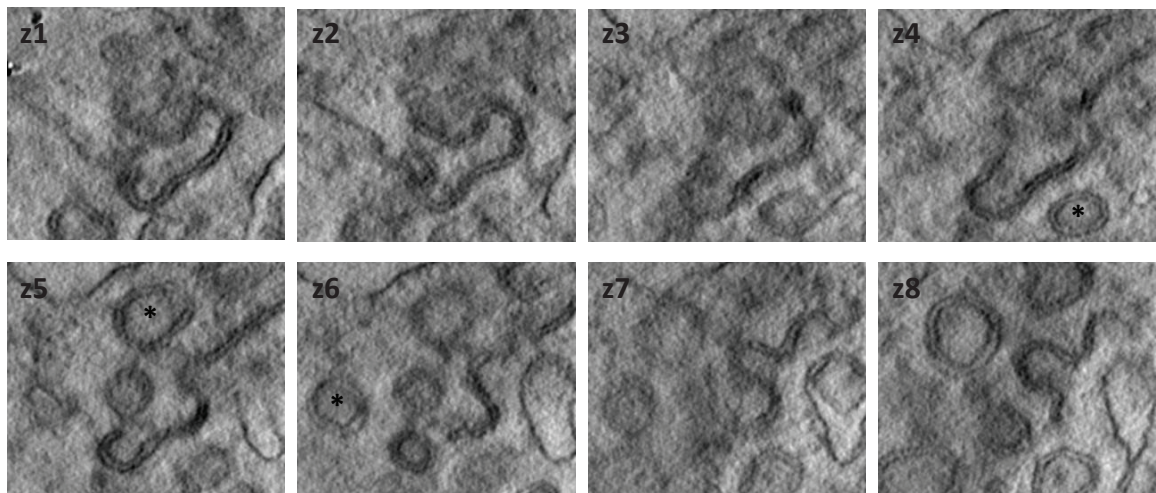
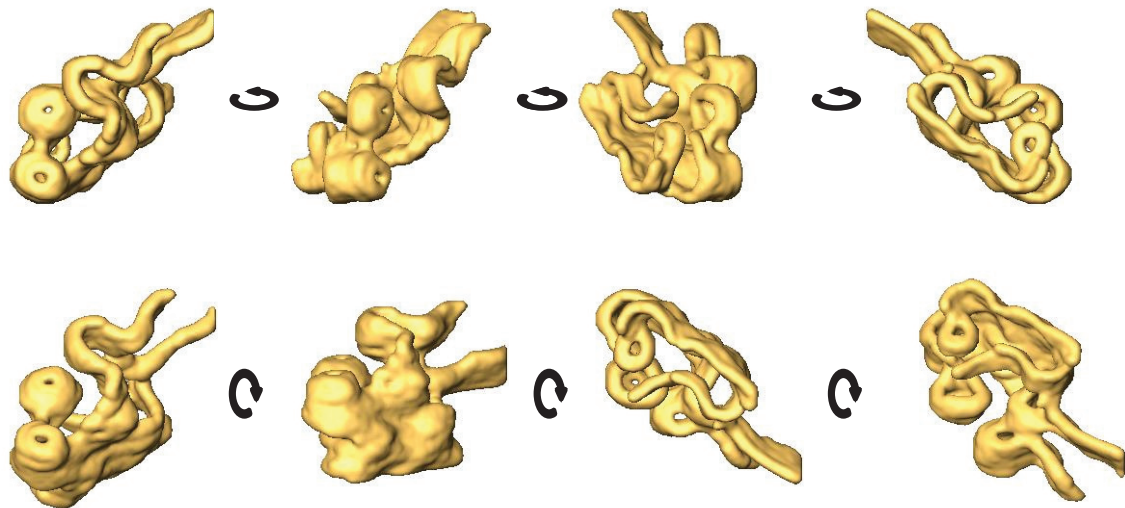
A**B****C**

Figura 23: Análisis ultraestructural de células infectadas con BEV a 16 hpi utilizando tomografía.

Para llevar a cabo los ensayos de tomografía se utilizaron secciones de aproximadamente 300 nm de grosor generadas a partir de monocapas de células E.Derm infectadas a 16 hpi. **A)** Imágenes representativas del tomograma una vez alineado. El cuadrado representa la región ampliada en B) y usada para generar la reconstrucción 3D mostrada en C). **B)** Secciones del tomograma capturadas cada 12nm siguiendo el eje z. El asterisco indica una DMV no reconstruida. **C)** Reconstrucción 3D mostrada en diferentes orientaciones, siguiendo un giro de izquierda a derecha en el panel superior, y de arriba abajo en el panel inferior. Barra 200 nm.

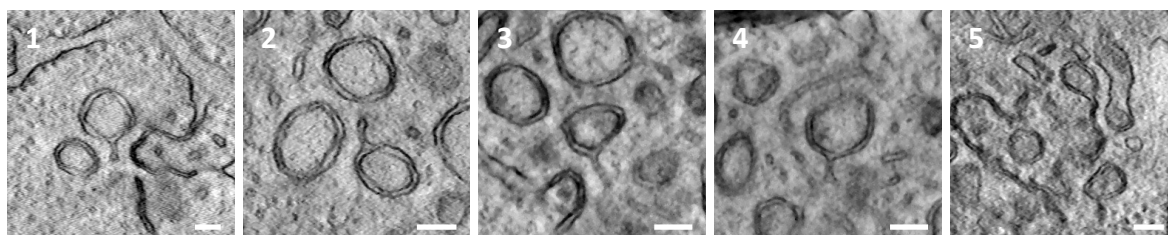


Figura 24: Las DMVs se conectan a través de la membrana externa.

Se muestran imágenes capturadas de los tomogramas de 6 hpi (1-2), 10 hpi (3-4) y 16 hpi (5) donde se observan prolongaciones de la membrana externa de las DMVs en forma de raqueta. Barra 200nm.

red reticulovesicular inducida por BEV, pensamos que el modelo más razonable que respondería a la formación de las estructuras observadas sería el ilustrado en el esquema 7. En él, la expresión del RNA viral a nivel del RE produce una gran acumulación de nsps, entre ellas los dominios transmembrana, los cuales podrían interaccionar entre sí para producir el acercamiento y colapso de las membranas del RE dando lugar a la formación de las estructuras en forma de láminas o paredes de membranas pareadas observadas durante

la infección con BEV. A la vez que se produce el colapso del RE, la propia acumulación e interacción de las proteínas transmembrana provocaría la curvatura de la estructura, induciendo la formación de la esférulas incompletas previamente vistas, las cuales terminan colapsando sus extremos para dar lugar a las típicas DMVs observadas. Según nuestro modelo, BEV no formaría realmente esférulas tal y como se describen para IBV, sino que serían estructuras intermedias en la formación de DMVs

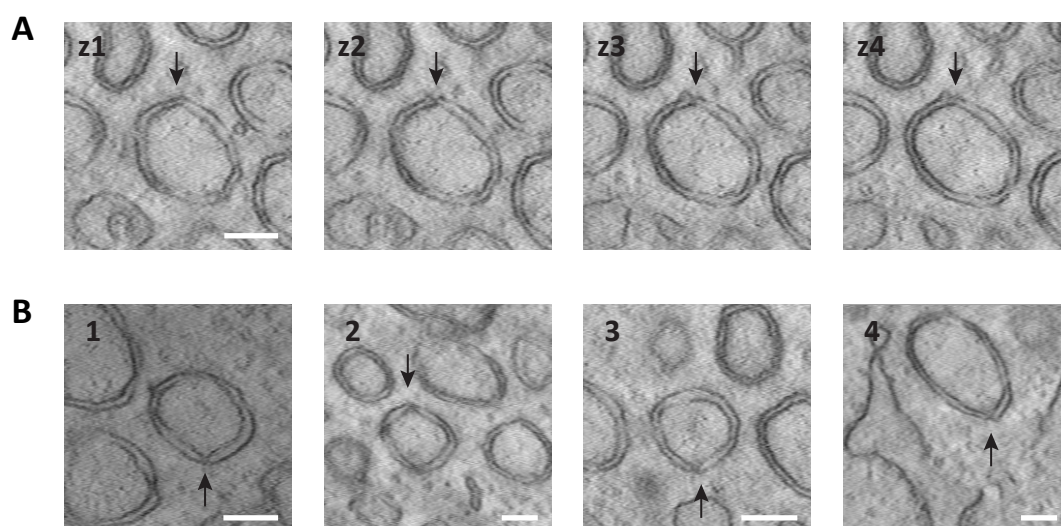
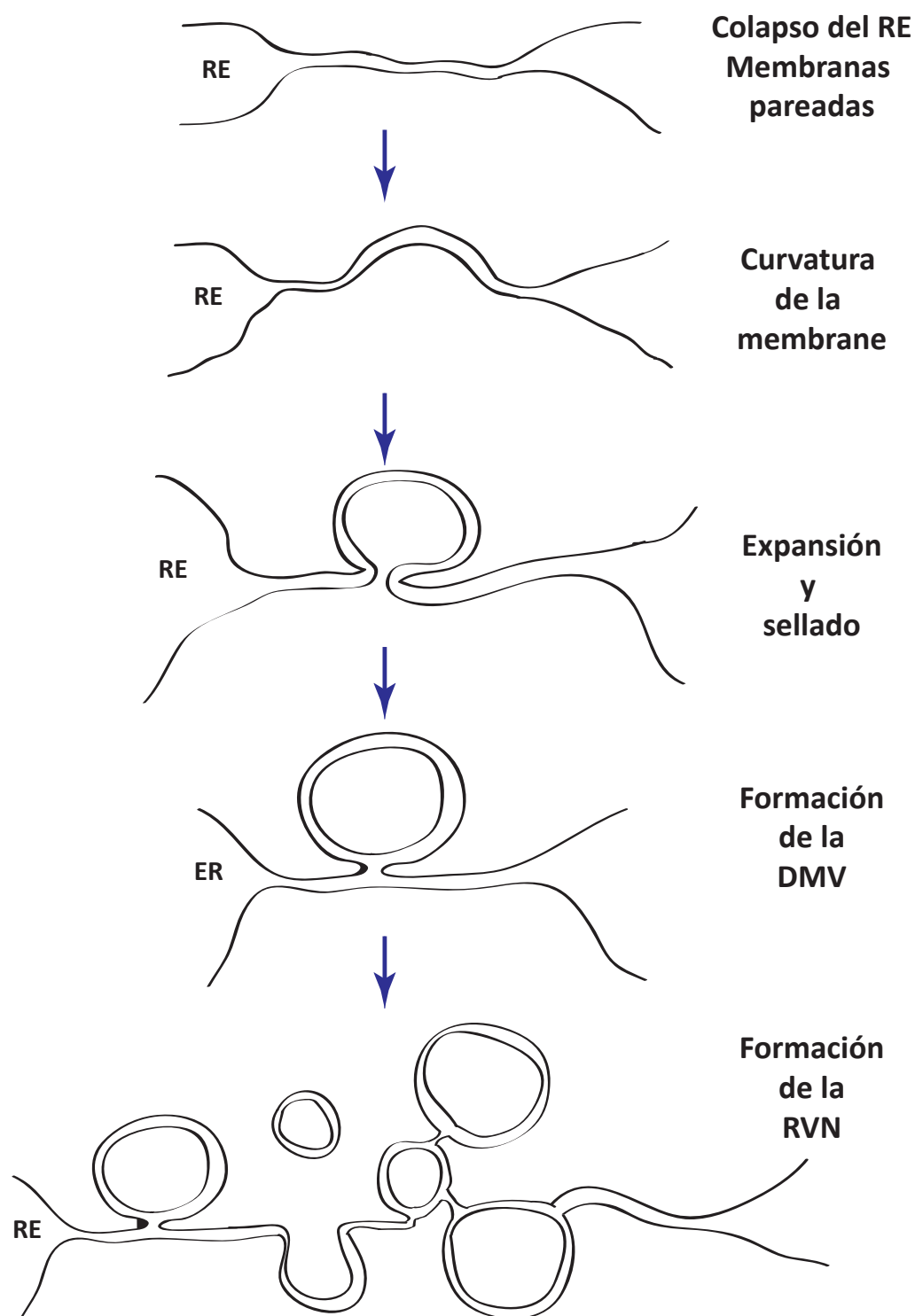
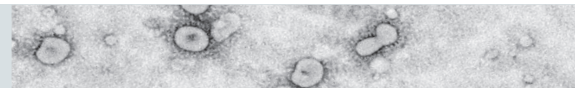


Figura 25: Análisis de la presencia de poros en las DMVs.

En los tomogramas de 6 hpi se observaron DMVs con discontinuidades en puntos concretos a modo de poros. **A)** serie tomográfica de 4 imágenes capturadas con un intervalo de 8 nm donde se puede apreciar la aparición de un posible poro (flecha). **B)** Ejemplos de posibles poros observados en otras DMVs de diferentes tomogramas de 6 hpi. Barra 200nm.



Esquema 7: Modelo propuesto de formación de la red reticulovesicular

En este modelo, las interacciones entre las proteínas nsps de BEV producen el colapso del RE dando lugar a la formación de las membranas pareadas. A la vez, estas interacciones producen la curvatura de la membrana pareada, la cual se expande y se curva a medida que se acumulan más proteínas. Finalmente se produce la formación de una vesícula de doble membrana una vez que ambos extremos se funden. La producción continuada de DMVs induce a su vez la formación de la red reticulovesicular de DMVs interconectadas entre ellas y con el RE a través de membranas pareadas.

III. Papel de la ruta autofágica en la infección de los torovirus

Como hemos comentado anteriormente, durante los estudios para localizar el origen membranoso de las DMVs observamos una posible redistribución de la proteína LC3B, marcadora de autofagosomas, entorno a la proteína M^{pro} a tiempos tardíos de infección, aunque no se observó una clara colocalización entre ambas proteínas (Fig. 26). Por ello, quisimos determinar el posible papel de esta ruta sobre la replicación viral.

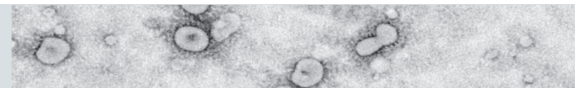
9. Formación de autofagosomas en las células infectadas con BEV

Para determinar si BEV realmente induce autofagia se examinó en primer lugar el estado de lipidación de la proteína LC3 endógena en las células infectadas con BEV. Para ello, se analizaron mediante inmunoblot con un anticuerpo policlonal específico frente a LC3B extractos de células E.Derm infectadas o no infectadas y lisadas a 8, 16 y 24 hpi. La infección se monitorizó utilizando el anticuerpo anti-N de BEV y como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina. Además, como control del ensayo se utilizaron extractos de células E.Derm tratadas durante 3 h con cloruro amónico (20 mM NH₄Cl) o Wortmanina (5 µM, Wn). Como se muestra en la figura 27A, la infección con BEV produce un incremento en la conversión LC3 I a LC3II a 16 y 24 hpi con respecto a su control sin infectar (mock), de manera similar a lo que ocurre en las células tratadas con NH₄Cl, donde se mantiene bloqueada la degradación de autofagosomas. Sin embargo, las células sin infectar mantienen unos niveles de lipidación similares a los que presentan las células con lipidación impedida por el tratamiento con Wn. Aunque la disminución de la proteína LC3 I de 18 kDa en beneficio de su forma lipidada LC3II

de 16 kDa resulta evidente en los extractos de células infectadas con BEV a 16 y 24 hpi, se calculó el ratio LC3II/I tras cuantificar por densitometría las bandas de LC3 del inmunoblot y relativizarlas frente a la actina. Como era de esperar (Fig. 27B) el ratio LC3II/I incrementa a medida que avanza la infección, lo que indica una clara acumulación de autofagosomas a dichos tiempos. En la figura 27A-B se muestra un ejemplo de tres ensayos realizados, obteniendo en todos ellos una tendencia idéntica, con un incremento significativo del ratio LC3II/I a 16 y 24 hpi con respecto a sus controles sin infectar, sin embargo, los valores entre réplicas mostraron una gran variabilidad con una gran desviación estándar entre ellos.

Para comprobar si realmente la inducción de autofagia por parte de BEV es dependiente de la replicación, y no es un mecanismo producido en respuesta a la entrada del virus, las células fueron inoculadas con un stock de BEV replicativamente inactivo tras someterlo a irradiación con luz ultravioleta (BEVi). Para ello, células E.Derm infectadas con BEV, BEVi o no infectadas (Mock) fueron lisadas a las 16 hpi o a las 24 hpi y sometidas a inmunoblot. Como se observa en la figura 27C, los extractos celulares infectados con BEVi no muestran señal de las proteínas estructurales M o N indicando la ausencia de replicación. Ante esta situación, en las células inoculadas con BEVi el estado de lipidación de LC3 es prácticamente idéntico al de las células sin infectar, donde la mayoría de la proteína permanece en su estado LC3 I. En cambio, en aquellos extractos celulares infectados con BEV se observa un claro incremento en la cantidad de LC3II con respecto a las células sin infectar o infectadas con BEVi. Este resultado demuestra que BEVi no induce autofagia, y por tanto la inducción de la autofagia requiere un virus replicativamente competente.

Otra criterio muy utilizado para el estudio de la ruta autofágica es la redistribución de la proteína LC3 desde su forma difusa citoplasmática (LC3 I) al característico patrón punteado en vesículas autofágicas localizadas en el citoplasma



(LC3II). Para confirmar si la infección de BEV induce autofagia, se generaron células E.Derm que expresan de manera heteróloga la proteína LC3 fusionada a la proteína GFP. Las células E.Derm_GFP-LC3 fueron generadas tal y como se indica en el apartado 3.9 de materiales y métodos, y se confirmó la presencia de la proteína GFP-LC3 mediante inmunofluorescencia e inmunoblot utilizando los anticuerpos anti-GFP y anti-LC3 para comprobar la existencia de las formas GFP-LC3 I y GFP-LC3II (datos no mostrados).

La redistribución de la proteína GFP-LC3 fue validada al tratar las células E.Derm_GFP-LC3 durante 3 horas con los inhibidores de autofagia 3-MA (10 mM) o HCQ (17 μ M), con el medio de ayuno EBSS o dejándolas sin tratar a modo de control (Sin). El ensayo muestra claramente como las células E.Derm_GFP-LC3 (Fig. 28A) presentan una distribución difusa cuando se bloquea la lipidación de LC3 tras el tratamiento con 3-MA. Sin embargo, las células con la autofagia activada tras someterlas a ayuno, o con la degradación de los autofagosomas bloqueada al impedir su acidificación con HCQ, muestran una distribución punteada. En el caso de las células sin tratar, en general, muestran una apariencia difusa, pero al no estar impedido el flujo autofágico algunas muestran cierto punteado, aunque nada comparable con el observado en las células tratadas. Una vez validado el sistema, se infectaron células E.Derm_GFP-LC3 con BEV o se mantuvieron sin infectar,

se fijaron a 16 hpi y se inmunomarcaron con el anticuerpo anti-M^{pro}. Como se observa en la figura 28B, las células infectadas con BEV mostraron una distribución punteada similar a la observada con los tratamiento con EBSS y HCQ, mientras que las células sin infectar (Mock) permanecieron con un patrón mucho más difuso.

Además, se llevó a cabo un ensayo cuantitativo, ampliando el estudio a 8 y 24 hpi, en el que se cuantificó el número de células positivas con puntos de GFP-LC3, considerando únicamente como células positivas aquellas que presentaban 10 o más puntos de GFP-LC3. Como control se cuantificaron los puntos de células tratadas durante 3 h con HCQ, EBSS o no tratadas. Como se observa en el gráfico de la figura 28C, a 16 y 24 hpi se produce un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células positivas GFP-LC3 en las células infectadas con respecto a las no infectadas, sin embargo a 8 hpi no se observa este incremento. De igual forma, entre las células tratadas el porcentaje de células positivas es muy alto, existiendo una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células sin tratar. Aunque el número de puntos de GFP-LC3 en el interior de una célula muestra una gran variación entre células, se observa una clara tendencia a aumentar en aquellas células donde la ruta está activa. Dado que el número de puntos de GFP-LC3 en el interior de una célula no se ajusta a una distribución normal, se cuantificó la mediana

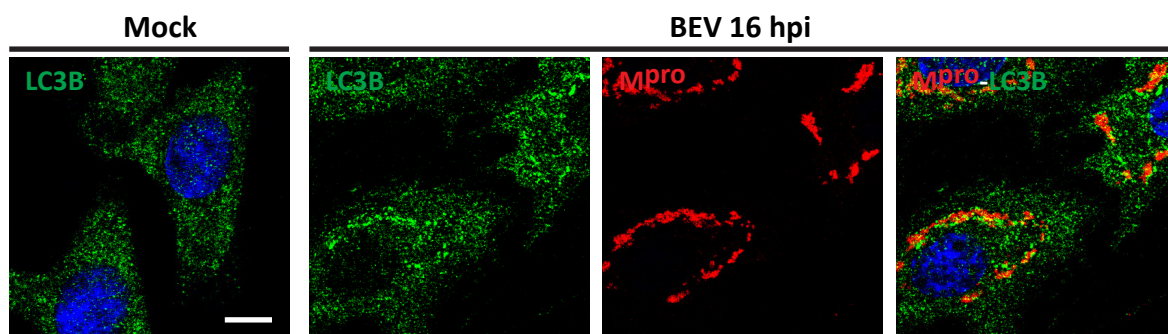


Figura 26. Análisis del origen de las membranas de las DMVs: Autofagosomas.

Ensayo de inmunofluorescencia en células E.Derm infectadas con BEV durante 16 h o no infectadas (Mock), utilizando el suero M^{pro} (rojo) para inmunomarcar los RTCs de BEV y un anticuerpo específico de LC3B (verde) como proteína marcadora de autofagosomas. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra 10 μ m.

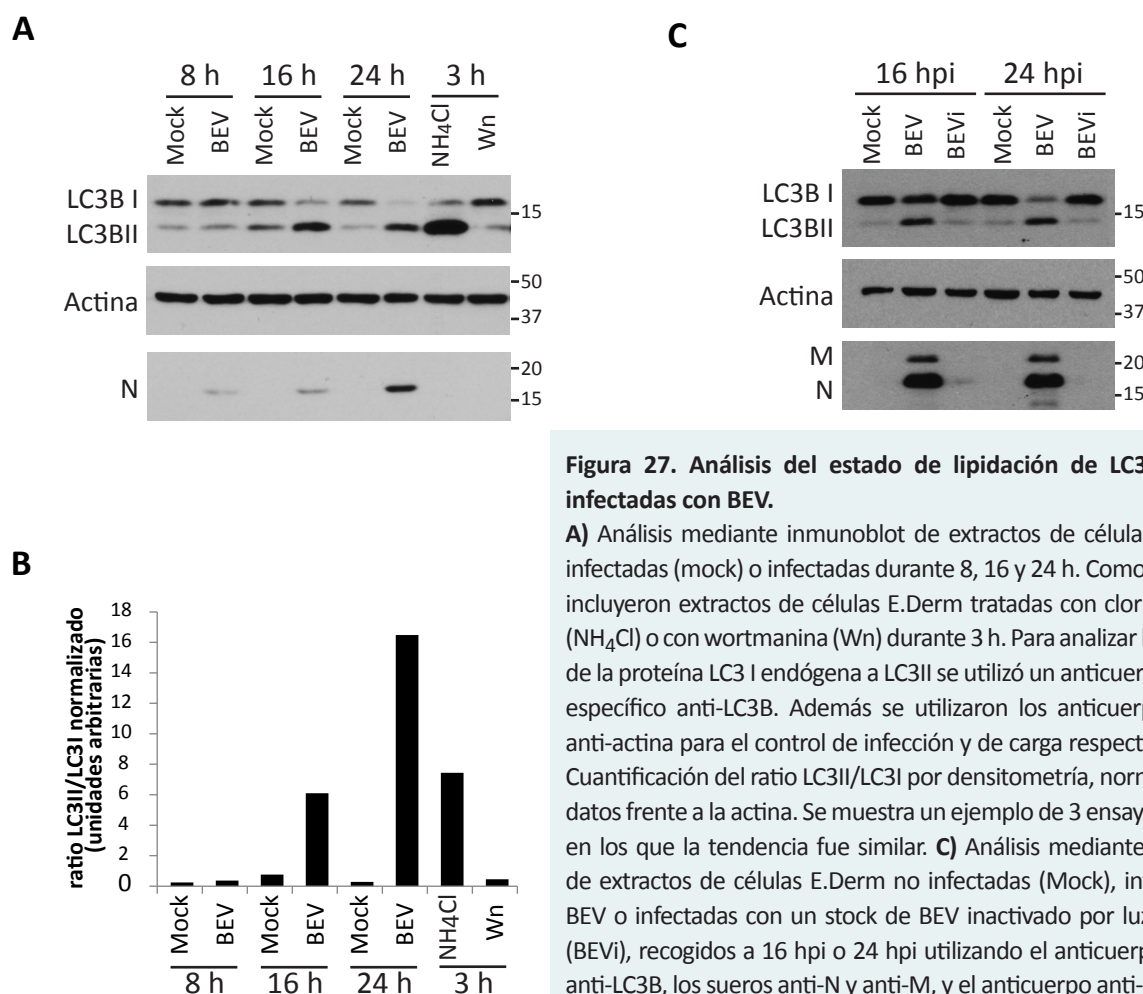


Figura 27. Análisis del estado de lipidación de LC3 en células infectadas con BEV.

A) Análisis mediante inmunoblot de extractos de células E.Derm no infectadas (mock) o infectadas durante 8, 16 y 24 h. Como controles se incluyeron extractos de células E.Derm tratadas con cloruro amónico (NH₄Cl) o con wortmanina (Wn) durante 3 h. Para analizar la conversión de la proteína LC3 I endógena a LC3II se utilizó un anticuerpo policlonal específico anti-LC3B. Además se utilizaron los anticuerpos anti-N y anti-actina para el control de infección y de carga respectivamente. **B)** Cuantificación del ratio LC3II/LC3I por densitometría, normalizando los datos frente a la actina. Se muestra un ejemplo de 3 ensayos realizados en los que la tendencia fue similar. **C)** Análisis mediante inmunoblot de extractos de células E.Derm no infectadas (Mock), infectadas con BEV o infectadas con un stock de BEV inactivado por luz ultravioleta (BEVi), recogidos a 16 hpi o 24 hpi utilizando el anticuerpo específico anti-LC3B, los sueros anti-N y anti-M, y el anticuerpo anti-actina.

de puntos GFP-LC3 por célula, obteniendo un claro incremento en su valor entre las células infectadas y las no infectadas, así como entre las células tratadas y no tratadas (Tabla 4).

Para descartar que la redistribución observada en la proteína GFP-LC3 tras la infección se deba a un efecto causado por interacciones entre las proteínas virales y la GFP, el ensayo se repitió en células transfectadas con el plásmido pGFP-C1 que expresa únicamente la proteína GFP. En este caso se obtuvo un patrón totalmente difuso de la GFP tanto en las células no infectadas como en las infectadas (Fig. 28D).

Los resultados muestran un incremento en la cantidad de autofagosomas presentes en las células equinas infectadas por BEV con respecto a las células sin infectar, produciéndose dicho incremento a tiempos tardíos de infección. Probablemente este incremento sea consecuencia

de la inducción de la ruta autofágica por parte de BEV, aunque con estos resultados no se puede descartar un posible bloqueo de la ruta promovido por BEV a nivel de degradación de autofagosomas que ocasione la acumulación de los mismos.

10. Efectos de la modulación farmacológica de la ruta autofágica sobre la infección de BEV

Para analizar el potencial efecto de la ruta autofagia sobre la infección de BEV, pretratamos células E.Derm durante 3 horas con distintos agentes moduladores de la ruta como son el 3-MA (10 mM), EBSS, NH₄Cl (20 mM) y la Wn (5 μ m), o no se trataron (Sin), y a continuación fueron infectadas con BEV. Con el objetivo de comprobar la correcta modulación de la autofagia, antes de iniciar la infección, parte de las células fueron lisadas y sometidas a

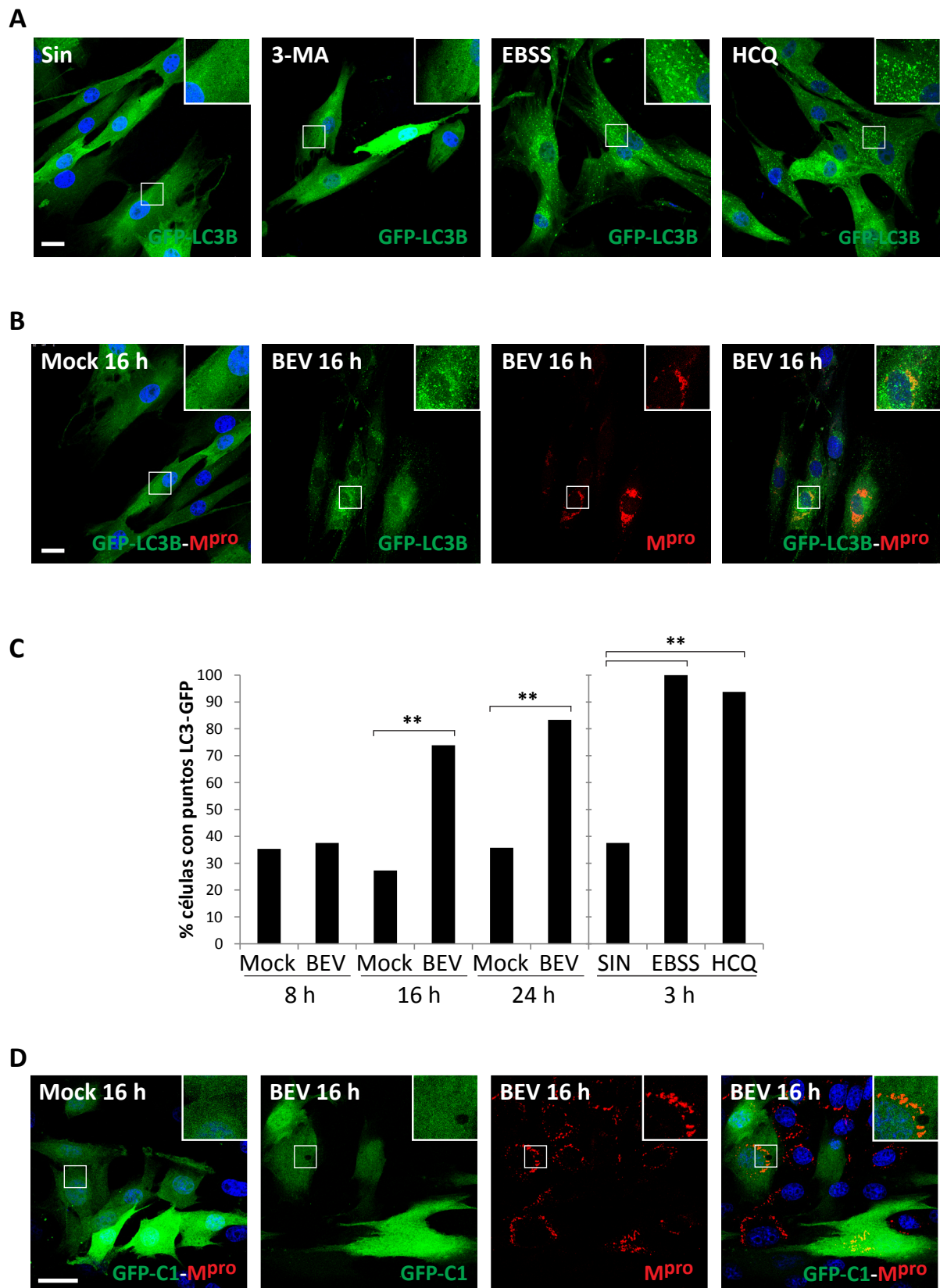
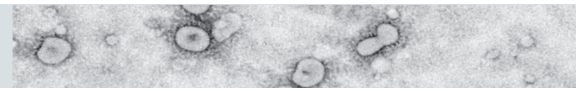


Figura 28. Redistribución de la proteína GFP-LC3B en células infectadas con BEV.

Para confirmar si la infección con BEV induce autofagia se generaron células E.Derm que expresan establemente la proteína recombinante GFP-LC3. **A)** Análisis de la distribución de la proteína recombinante GFP-LC3 tras el tratamiento con agentes moduladores de la autofagia. Las células E.Derm GFP-LC3 fueron tratadas con los inhibidores de autofagia

3-MA (10 mM) o hidroxycloquina (17 μ M, HCQ), sometidas a ayuno con EBSS durante 3 h o no tratadas (Sin), y seguidamente fueron fijadas. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). **B)** Análisis de la distribución de la proteína recombinante GFP-LC3 en células E.Derm GFP-LC3 infectadas con BEV o no infectadas (Mock). Las células se fijaron a las 16 hpi y se inmunomarcaron con el anticuerpo anti-M^{pro}. **C)** Cuantificación del porcentaje de células con puntos de GFP-LC3. El ensayo se realizó sobre células infectadas a 8, 16 y 24 hpi, cuantificando como control los puntos de células tratadas durante 3 h con HCQ, EBSS y no tratadas (SIN). Solo aquellas células que presentan 10 o más puntos de GFP-LC3 fueron consideradas positivas (n=50). ** p<0.001. El gráfico corresponde a un ejemplo representativo de 3 ensayos donde se observa una tendencia similar. **D)** Ensayo control en células E.Derm transfectadas con el plásmido pGFP-C1, que expresa la proteína recombinante GFP, a las 24 h post-transfección fueron infectas con BEV o mock infectadas. A las 16 hpi las células fueron fijadas e inmunomarcadas con el anticuerpo anti-M^{pro}. Barras 25 μ m.

inmunoblot para analizar la conversión de LC3 I a LC3II. Como se observa en la figura 29A, aquellas células tratadas con 3-MA o Wn muestran un incremento en la cantidad de LC3 I a consecuencia de la inhibición de la ruta a nivel de la formación de los autofagosomas, en cambio en aquellas células en las que está impedida la degradación (NH₄Cl) prácticamente toda la proteína está en su forma LC3II asociada a los autofagosomas. Con EBSS hay un efecto intermedio, se observa una conversión de LC3 I a LC3II a consecuencia de la activación de la ruta, pero es solamente sutil, ya que a la vez que los autofagosomas se están formando estos están siendo degradados. Bajo estas condiciones las células fueron infectadas con BEV, analizando a las 16 hpi la producción de virus infectivo extracelular (pfu/ml) mediante el ensayo de titulación en placa. Como se observa en el diagrama de la figura 29B, no hubo cambios significativos en la producción de BEV tras inhibir (3-MA o Wn) o activar (EBSS) la ruta autofágica con respecto a las células sin tratar (Sin). De igual forma, no se observaron diferencias significativas en la acumulación de virus extracelular cuando se impidió la degradación de los autofagosomas (NH₄Cl).

11. Efecto del silenciamiento de proteínas clave de la ruta autofágica sobre la infección de BEV

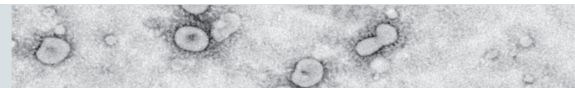
Para complementar los estudios realizados con los agentes farmacológicos, la ruta autofágica fue bloqueada a través del silenciamiento de proteínas esenciales para el correcto funcionamiento de la misma, como son Beclin 1, Atg4B y LC3B.

11.1. Efecto del silenciamiento de Beclin1

Para estos estudios generamos células E.Derm que expresan establemente un shRNA frente a Beclin 1 o un shRNA irrelevante (control) utilizando un sistema lentiviral tal y como se indica en el apartado 3.10.2 de materiales y métodos. Las células silenciadas y las células control fueron sembradas sobre placas de 24 pocillos (0,4x10⁶ células por pocillo). Al día siguiente, las células fueron infectadas con BEV o no infectadas (Mock), y recogidas a las 16 hpi. Los extractos celulares se analizaron por inmunoblot utilizando los anticuerpos frente a Beclin 1 y LC3B, o tubulina

Tabla 4: Mediana del número de puntos GFP-LC3 por célula.

| | | Mock 8 h | BEV 8 h | Mock 16 h | BEV 16 h | Mock 16 h | BEV 16 h | Sin | EBSS | HCQ |
|-----------------------------|---------|-------------|------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-----|------|-----|
| Número de puntos GFP | Min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 17 | 4 |
| | Mediana | 1 | 6 | 6 | 31 | 6 | 43 | 8 | 48 | 44 |
| | Max | 80 | 175 | 63 | 80 | 78 | 170 | 33 | 84 | 116 |
| % de células con puntos GFP | | 35 | 38 | 27 | 74 | 36 | 83 | 38 | 100 | 94 |



como control de carga. Como se observa en la figura 30A, las células shRNA Beclin 1 muestran una fuerte reducción en la producción de Beclin 1, de aproximadamente un 80 %, la cual se mantiene durante la infección con BEV. Como se esperaba, la cantidad de LC3II estuvo significativamente reducida en estas células, manteniéndose los niveles de LC3II en las células shRNA Beclin 1 infectadas similares a los que presentan las células control o no transducidas en condiciones de no infección. Para determinar si el silenciamiento de Beclin 1 tiene efecto sobre la replicación de BEV se recolectaron los sobrenadantes de las células infectadas a las 16 hpi y se determinaron los títulos virales. Como se muestra en la figura 30B no se observaron diferencias significativas en la producción extracelular de BEV entre las células deficientes en Beclin 1 y las células control.

A continuación se llevó a cabo el silenciamiento de Beclin 1 con un segundo shRNA (Beclin1-KD). A diferencia del ensayo anterior, en este caso se utilizó un sistema retroviral para general células E.Derm establemente silenciadas para Beclin 1. Nuevamente, se observó una considerable reducción de la proteína Beclin 1

en las células shRNA Beclin1-KD con respecto a las células control (Fig. 30C), pero al igual que en el caso anterior, BEV replica eficientemente en las células carentes de beclin 1, no mostrando diferencias significativas en la producción de virus extracelular con respecto a las células control (Fig. 30D).

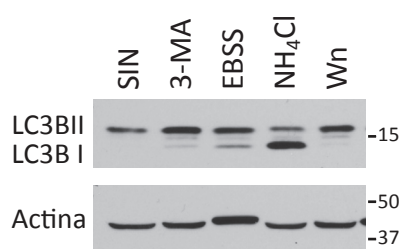
11.2. Efecto del silenciamiento de Atg4B

A la vez que se generaban las células shRNA Beclin 1, se generaron dos líneas de células E.Derm que expresan establemente un shRNA frente a Atg4B (shRNA800 y shRNA801) (Fig. 30 E-F). Estas células y las células control fueron infectadas con BEV o no infectadas (Mock), y recogidas a las 16 hpi. Nuevamente no se observaron diferencias considerables en la producción de virus extracelular entre las células control y las células silenciadas, aunque es cierto que en este caso el nivel de silenciamiento fue algo pobre, obteniéndose niveles de LC3II prácticamente idénticos entre las células shRNA Atg4B y las control, lo que indicaría que la ruta autofágica no está bloqueada (Datos no mostrados).

11.3. Efecto del silenciamiento de LC3B

Los diferentes resultados obtenidos tanto a nivel de modulación farmacológica como a través del silenciamiento de una proteína clave para la autofagia como es Beclin 1, indican que

A



B

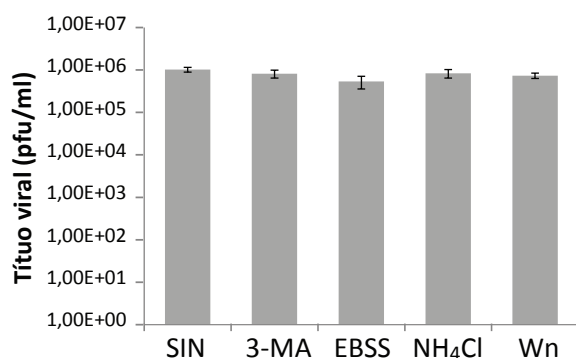
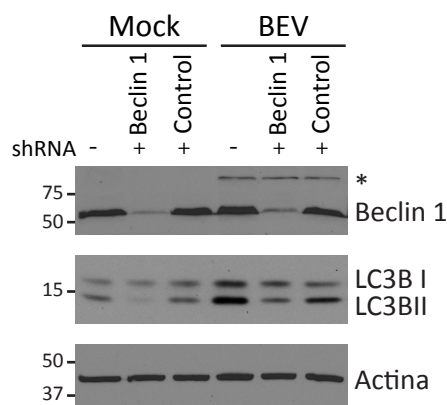
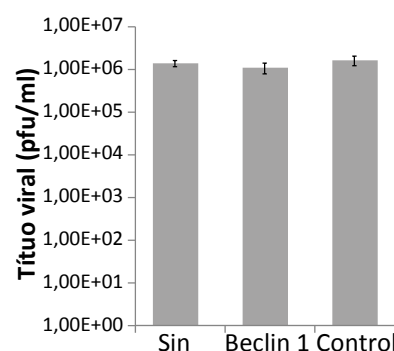


Figura 29. Efecto de la modulación farmacológica de la ruta autofágica sobre la infección de BEV. Se trataron células E.Derm durante 3 h con distintos agentes moduladores de la ruta, como el 3-MA (10 mM), EBSS, NH₄Cl (20 mM) y Wn (5 μM) o no se trataron (Sin), y a continuación fueron infectadas con BEV. **A)** Ensayo de inmunoblot para analizar la conversión de LC3 I a LC3II en células E.Derm tratadas durante 3 h con los distintos agentes antes de la infección con BEV. Para ello se utilizó un anticuerpo policlonal anti-LC3B, y el anticuerpo anti-actina como control de carga. **B)** Cuantificación de la producción de virus infeccioso extracelular en los sobrenadantes de los cultivos recogidos a 16 hpi (n=3) mediante un ensayo de titulación en placa (pfu/ml).

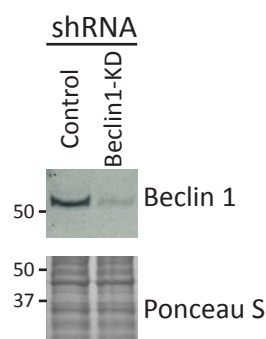
A



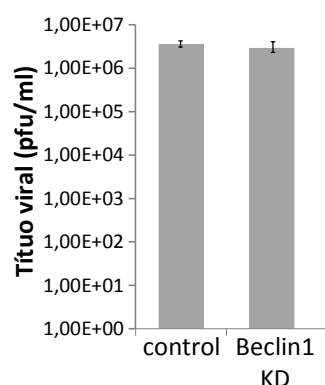
B



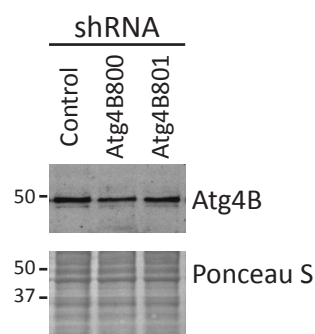
C



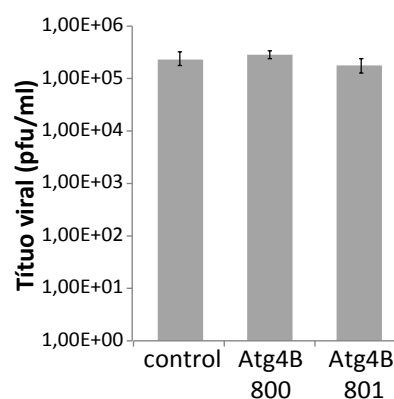
D



E



F



al menos la ruta clásica de autofagia no parece ser fundamental para el ciclo vital de BEV. Con el objetivo de verificar completamente estos resultados y ante la posibilidad de que la proteína LC3 juegue un papel alternativo independiente de autofagia como indican algunos autores (Monastyrskaya y col., 2013; Reggiori y col., 2010), se decidió ampliar los ensayos de silenciamiento

a la proteína LC3B. Para ello, se silenciaron células E.Derm utilizando lentivirus que portan un shRNA específico frente a LC3B (a lo largo del ensayo se han utilizado varios shRNA de forma independiente que se nombran como shRNA LC3B 0, 1, 2, 3, y 4) o un shRNA irrelevante (shRNA control). Los ensayos se llevaron a cabo en la ventana de tiempo entre los días 5 y 12 post-transducción, que es el periodo

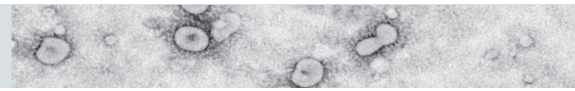


Figura 30. Efecto del silenciamiento de Beclin 1 o Atg4B sobre la infección de BEV.

A) Se generaron células E.Derm que expresan establemente un shRNA frente a Beclin 1 (shRNA Beclin 1) o un shRNA irrelevante (shRNA Control) utilizando un sistema lentiviral. Para comprobar el correcto silenciamiento, se infectaron con BEV células E.Derm, células E.Derm_shRNA Beclin 1 y células E.Derm_shRNA control o se mantuvieron sin infectar (Mock), se lisaron a 16 hpi y se analizaron mediante inmunoblot utilizando anticuerpos específicos anti-Beclin 1 y anti-LC3B. La actina fue utilizada como control de carga. El asterisco muestra el reconocimiento inespecífico de una proteína viral. **B)** Los sobrenadantes producidos en A) recogidos a las 16 hpi (n=3) fueron usados para determinar la producción de virus extracelular mediante titulación en placa (pfu/ml). **C)** Se generaron células E.Derm que expresan establemente un segundo shRNA frente a Beclin 1 (shRNA beclin1-KD) o un shRNA irrelevante (Control) utilizando un sistema retroviral. Ambas líneas celulares fueron infectadas con BEV, lisadas a las 16 hpi y analizadas mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-Beclin 1. Como control de carga se tiñeron las proteínas totales con solución Ponceau S. **D)** Análisis de la producción de virus extracelular generado en C). **E)** Se generaron 2 líneas de células E.Derm que expresan establemente un shRNA frente a Atg4B, utilizando un sistema lentiviral (shRNA Atg4B 800 y Atg4B 801). Ambas líneas celulares junto a las células control fueron infectadas con BEV, recogidas a las 16 hpi y analizadas mediante inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-Atg4B. Como control de carga se tiñeron las proteínas totales con solución Ponceau S. **F)** Análisis de la producción de virus extracelular generado en los cultivos tratados tal como se describe en el apartado E). Los gráficos muestran un ejemplo representativo de 3 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno.

en el que las células están silenciadas y presentan una morfología adecuada. Para comprobar el correcto silenciamiento los extractos de células E.Derm silenciadas con los distintos shRNA LC3B o el shRNA control, e infectadas durante 16 horas con BEV o no infectadas (Mock), fueron sometidos a análisis por inmunoblot (Fig. 31A). Como control las células se trataron durante 3 h con NH_4Cl . Claramente, los shRNA LC3B 0, 1 y 4 generaron un gran silenciamiento con una reducción de entre un 85-90 % en la cantidad de proteína LC3 total con respecto al shRNA control. En el caso del shRNA LC3B 3 se obtuvo un silenciamiento intermedio del orden de un 50 %, mientras que el shRNA LC3B 2 no mostró silenciamiento en estas células, presentando unos niveles de LC3 similares a los de las células control. Al igual que en los ensayos anteriores, con Beclin 1 o Atg4B, los sobrenadantes de las células infectadas fueron recolectados y sometidos a titulación. Nuevamente no se observan mayores cambios en la producción de BEV extracelular entre aquellas células deficientes en LC3B y las células control (Fig. 31B).

Todos estos resultados muestran que BEV induce autofagia en las células E.Derm, pero la modulación de la misma no afecta al ciclo infectivo de BEV.

12. Análisis del flujo autofágico durante la infección con BEV

12.1 Estado del flujo autofágico durante la infección con BEV

Un aumento en el número de autofagosomas en las células puede ser debido a la inducción de la ruta autofágica o a la inhibición del flujo autofágico a nivel de degradación de autofagosomas. Para comprobar si la infección con BEV induce una acumulación de autofagosomas vía inhibición del flujo autofágico, se monitorizó dicho proceso empleando un plásmido que expresa el tándem mCherry-GFP-LC3. Esta construcción permite monitorizar tanto la formación de autofagosomas como su degradación (autolisosoma) en base a que en un ambiente ácido la señal de GFP está desactivada debido al bajo pH, mientras que la mCherry permanece estable. Como muestra la figura 32A, el ensayo fue validado en células E.Derm transfectadas con el plásmido mCherry-GFP-LC3, las cuales a las 24 h post-transfección fueron tratadas durante 3 h con NH_4Cl (20 mM), HCQ (17 μM), puestas en ayuno con EBSS o no se trataron (Sin). Tras el tratamiento las células fueron fijadas con 4 % de PFA e incubadas con DAPI

siguiendo el protocolo de inmunofluorescencia descrito en materiales y métodos, y examinadas en el microscopio de fluorescencia. La proteína mCherry-GFP-LC3 mostró un patrón normal con una localización difusa en condiciones normales

(Sin) y el característico patrón punteado en vesículas autofágicas cuando la ruta está activa. Estas vesículas pueden ser estructuras con un interior neutro (autofagosomas) que exhiben simultáneamente las señales fluorescentes roja

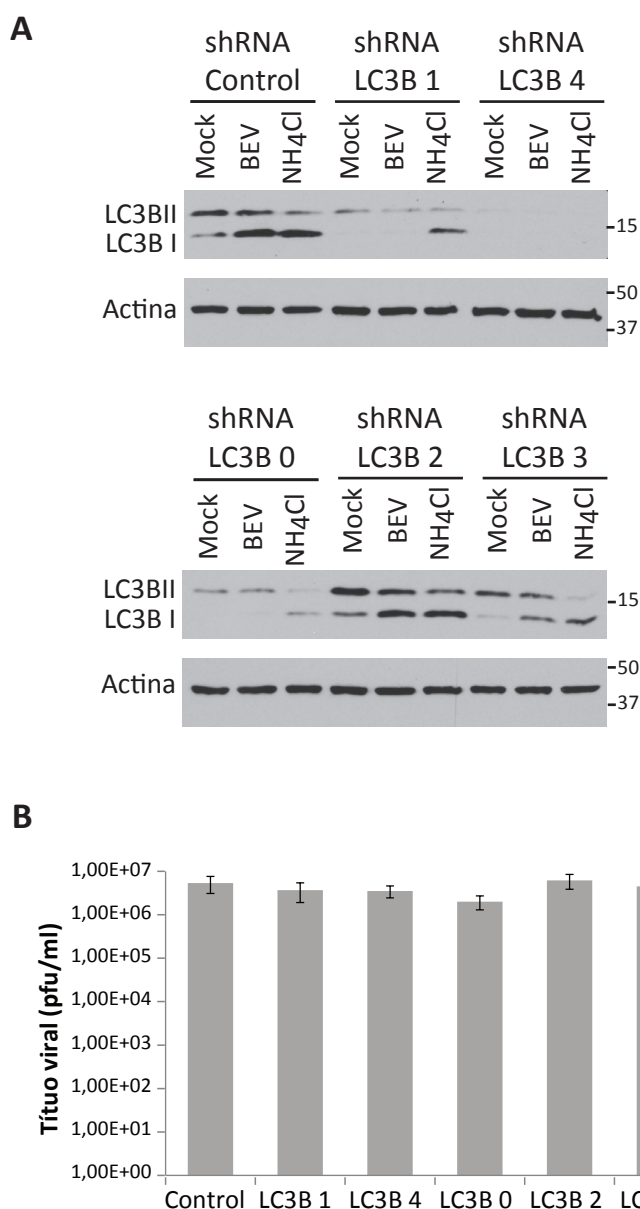
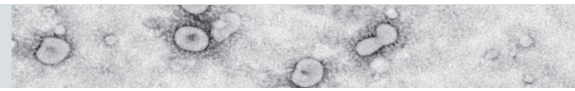


Figura 31: Efecto del silenciamiento de LC3B sobre la infección de BEV.

Se generaron células E.Derm establemente silenciadas para LC3B utilizando diferentes lentivirus que portan shRNAs específicos (shRNA LC3B 0, LC3B 1, LC3B 2, LC3B 3 y LC3B 4). Como control se generaron células que portan un shRNA irrelevante (shRNA Control). **A)** Las células tratadas con los lentivirus se infectaron con BEV en la ventana de tiempo del día 5 al 12 post-transducción, o se mantuvieron sin infectar (Mock), se recogieron a las 16 hpi y se analizaron mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo específico anti-LC3B. Como control las células se trataron durante 3 h con NH₄Cl. La actina fue utilizada como control de carga. **B)** Análisis de la producción de virus extracelular generado en los cultivos (n=3) tratados tal como se describe en el apartado en A). El gráfico muestra un ejemplo representativo de 3 ensayos independientes con 3 replicas cada uno.



y verde, o vesículas ácidas (autolisosomas) que exhiben únicamente una señal fluorescente roja. Bajo condiciones de ayuno (EBSS), cuando el flujo permanece activo, se observan ambos tipos de vesículas. Sin embargo, cuando el flujo autofágico permanece bloqueado por agentes que impiden la acidificación lisosomal (HCQ o NH_4Cl), solo se observan estructuras neutras. Para estudiar el estado del flujo autofágico durante la infección con BEV, se infectaron células transfectadas 24 h antes con el plásmido que expresa la proteína de fusión mCherry-GFP-LC3, y se fijaron a las 16 hpi. Estas células, y las células control sin infectar, fueron procesadas para inmunofluorescencia usando el anticuerpo frente a la M^{pro} como control

de infección. Como muestra la figura 32B, en condiciones de infección con BEV, las células mostraron un flujo activo similar al observado en las células sometidas a ayuno con EBSS, observándose ambos tipos de vesículas ácidas y neutras.

12.2 Papel del flujo autofágico durante la infección con BEV

Para determinar si el mantenimiento de un flujo autofágico activo es beneficioso para la replicación de BEV se diseñó un experimento en el que se bloqueó la degradación de autofagosomas con NH_4Cl (20 mM) y HCQ (17 μM) desde las 3 hpi a las 8 hpi, cubriendo el periodo desde que la replicación de BEV se inicia hasta que

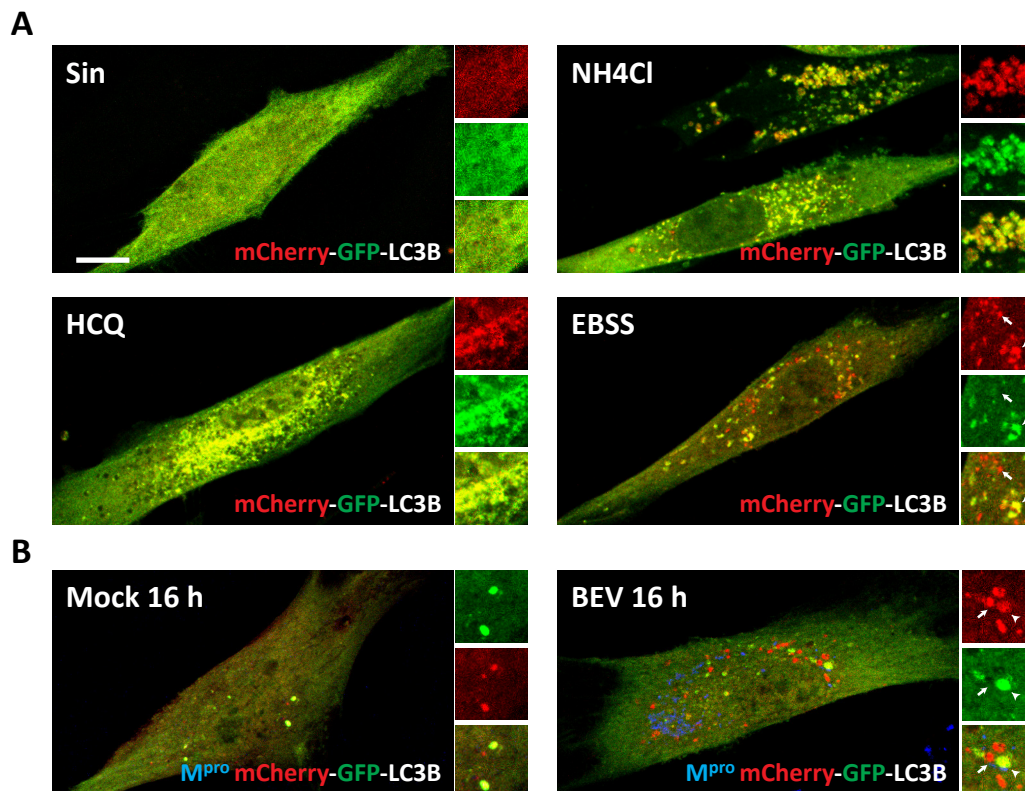


Figura 32. Estado del flujo autofágico durante la infección con BEV.

Para analizar el flujo autofágico se empleó un plásmido que expresa el tándem mCherry-GFP-LC3, que permite distinguir un ambiente ácido (autolisosoma), donde la señal de la GFP se apaga mientras que la mCherry es estable, de un ambiente neutro (autofagosoma) donde se observan las señales de ambas proteínas. **A)** Para validar el ensayo, se utilizaron células E.Derm transfectadas con el plásmido mCherry-GFP-LC3 y a las 24 h post-transfección las células fueron tratadas durante 3 h con los inhibidores NH_4Cl (20 mM) o HCQ (17 μM), sometidas a ayuno con EBSS o no se trataron (Sin). **B)** A las 24 h post-transfección las células fueron infectadas con BEV o no infectadas (Mock) y a las 16 hpi fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia usando el suero frente a la M^{pro} de BEV. Cada panel muestra una visión general de una célula con una zona representativa ampliada a su derecha donde se muestra la señal roja (mCherry) y verde (GFP) por separado, y el solapamiento de ambas. La flecha indica autolisosomas y el triángulo autofagosomas. Barra 10 μm .

está funcionando activamente (Fig. 10), para posteriormente retirar el tratamiento y mantener la infección hasta las 18 hpi. Para comprobar la efectividad de los tratamientos los extractos de las células infectadas con BEV o no infectadas (Mock) recogidas a las 18 hpi, en las que la degradación de autofagosomas se mantuvo bloqueada de 3 a 8 hpi, se analizaron mediante inmunoblot con un anticuerpo específico anti-LC3 (Fig. 33A). Además, para comprobar el correcto bloqueo de la degradación de autofagosomas, se analizaron células sin infectar tratadas y recogidas justo tras finalizar el tratamiento (Mock 8 h), observándose en ellas un patrón normal con una gran acumulación de LC3II con respecto a su control sin tratar. En el caso de las células sin infectar tratadas hasta las 8 h y mantenidas hasta las 18 h (Mock 18 h) se observa que tras eliminar el bloqueo, la degradación de autofagosomas se inicia nuevamente, reduciéndose considerablemente los niveles de LC3II con respecto a su control de 8 h. Sin embargo, en el caso de las células infectadas no se observan diferencias en los niveles de LC3II entre las células tratadas y las no tratadas.

Bajo estas condiciones, se analizaron por PCR cuantitativa los niveles de RNA viral acumulados tras 18 h de infección, y se determinaron los títulos de virus extracelular. Como se muestra en la figura 33B-C, no hubo diferencias considerables entre la cantidad de RNA viral producido en las células con la degradación de autofagosomas bloqueada de 3 a 8 hpi y las células no tratadas, así como tampoco se observaron diferencias significativas en la producción de virus extracelular.

En general todos los resultados obtenidos muestran que aunque BEV induce autofagia en las células E.Derm, esta no es requerida para la replicación de BEV. En el caso del virus de la Polio se ha descrito un efecto beneficioso de la autofagia, independiente de la replicación, relacionado con la maduración de sus partículas virales en vesículas autofágicas ácidas (Richards y col., 2012). Dado que BEV induce un flujo autofágico activo a tiempos tardíos de infección, se decidió analizar

si la acidificación lisosomal que se observó tras la infección con BEV es un proceso necesario a estos tiempos. Para ello se trataron células E.Derm con NH_4Cl y HCQ desde las 12 hpi hasta las 18 hpi, periodo en el que mayoritariamente las partículas virales de BEV son liberadas al medio extracelular. Como se observa en la figura 34A, ambas drogas bloquearon la degradación de autofagosomas tal y como indica la gran acumulación de LC3II en las células tratadas pero no infectadas (Mock) con respecto al control sin tratar. Bajo estas condiciones, no se observan cambios sustanciales en la cantidad de RdRp acumulada o en los niveles de mRNA viral producido entre las células con la acidificación de los autofagosomas impedida o las células sin tratar a tiempos tardíos de infección (Fig. 34A-B), indicando nuevamente que este proceso no es necesario para la replicación de BEV. De igual forma, el mantener bloqueada la acidificación de los autofagosomas a tiempos tardíos de infección no parece tener un efecto negativo sobre BEV, ya que los títulos de BEV extracelular infectivo producidos bajo estas condiciones son similares a los obtenidos en células sin tratar (Fig. 34C).

En conjunto, todos estos resultados muestran que BEV induce autofagia a tiempos tardíos de infección, pero esta no es necesaria para el funcionamiento del ciclo infectivo de BEV, siendo probablemente un mecanismo desencadenado por la propia célula para tratar de combatir la infección.

13. BEV induce una autofagia selectiva

Aunque tradicionalmente se ha pensado en la ruta autofágica como una vía de degradación inespecífica, en los últimos años se ha descrito como una ruta altamente selectiva, utilizando proteínas receptoras para cargar específicamente agregados de proteínas, microorganismos u orgánulos dañados. Una de estas proteínas es p62, la cual tiene un dominio de unión a ubiquitina y otro a LC3 que le permite cargar selectivamente proteínas marcadas con ubiquitina en autofagosomas para

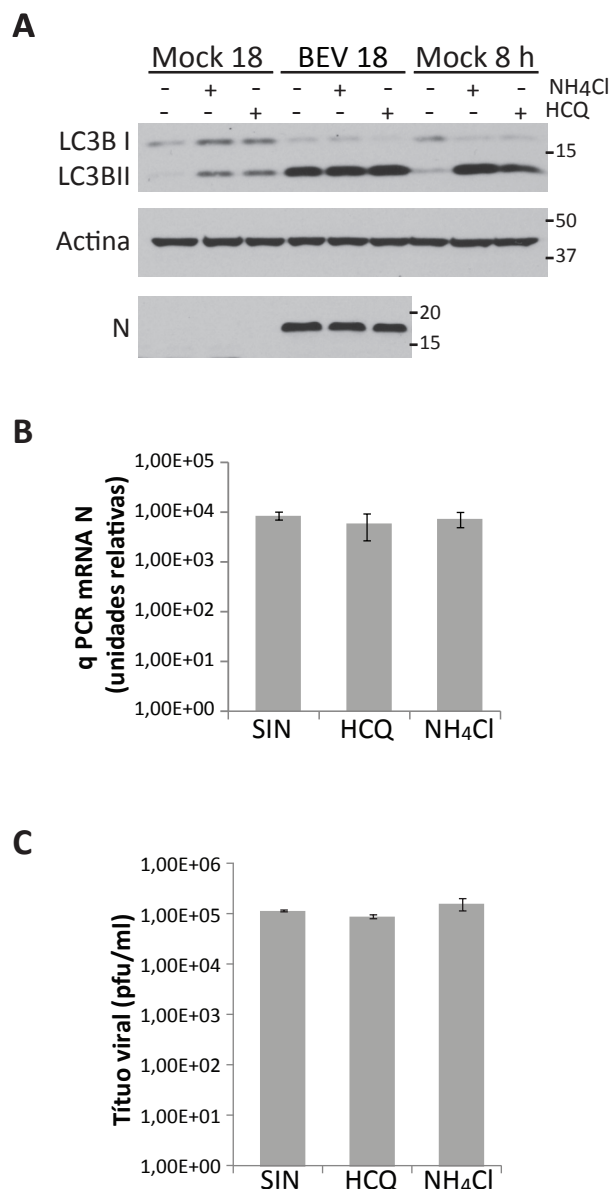
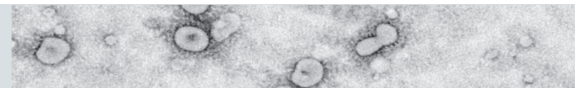


Figura 33. Efecto del bloqueo del flujo autofágico durante el periodo de máxima replicación de BEV.

Células E.Derm infectadas con BEV o no infectadas (Mock) fueron tratadas con NH₄Cl (20 mM) o HCQ (17 μ M) desde las 3 hpi a las 8 hpi, para seguidamente retirar el tratamiento y mantener la infección hasta las 18 hpi. **A)** Análisis por inmunoblot de los extractos celulares recogidos a las 18 hpi utilizando un anticuerpo específico anti-LC3. Además se incluyeron extractos celulares tratados en paralelo y recogidos a las 8 h tras finalizar el tratamiento (Mock 8 h). Como control de carga y replicación se usaron la actina y la proteína N de BEV respectivamente. **B)** Cuantificación del RNA viral producido en A) a las 18 hpi medido por qRT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región codificadora de la proteína N. Los datos fueron normalizados frente al mRNA celular correspondiente a la proteína HPRT1. **C)** Análisis de la producción de virus extracelular generado en los cultivos (n=3) tratados tal como se describe en el apartado en A). El grafico muestra un ejemplo representativo de 3 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno.

ser degradadas. Para comprobar si BEV induce una autofagia selectiva, células infectadas o no infectadas (mock) fueron fijadas a 8 y 16 hpi y sometidas a inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos frente a p62, LC3 y la M^{pro}

de BEV. Debido a que el anticuerpo anti-p62 solo reconoce la proteína p62 humana, los ensayos se hicieron en células MRC5. Como se observa en la figura 35A, la proteína p62 se localiza de forma dispersa en las células sin infectar o en aquellas

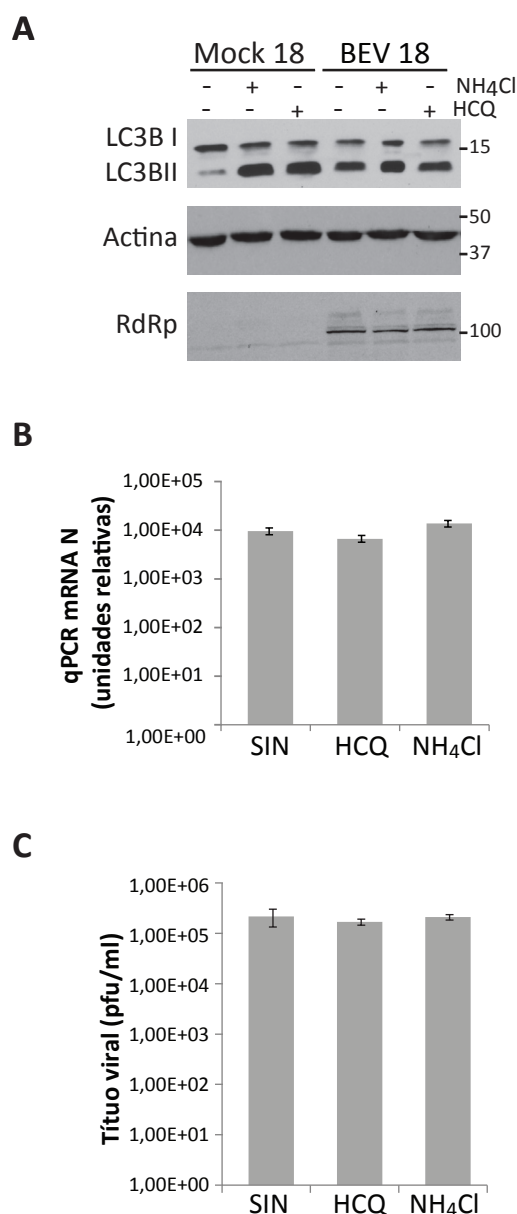


Figura 34: Efecto del bloqueo del flujo autofágico sobre BEV a tiempos tardíos de infección. Células E.Derm infectadas con BEV o no infectadas (Mock) fueron tratadas con NH₄Cl (20 mM) o HCQ (17 μM) desde las 12 hpi a las 18 hpi. **A)** Análisis por inmunoblot de los extractos celulares recogidos a las 18 hpi utilizando un anticuerpo específico anti-LC3. Además se usaron el anticuerpo anti-actina y el suero anti-RdRp de BEV como controles de carga y de infección respectivamente. **B)** Cuantificación del RNA viral producido en A) a las 18 hpi medido por qRT-PCR utilizando oligos nucleótidos específicos de la región codificadora de la proteína N. Los datos fueron normalizados frente al mRNA celular correspondiente a la proteína HPRT1. **C)** Análisis de la producción de virus extracelular generado en los cultivos (n=3) tratados tal como se describe en el apartado en A). El grafico muestra un ejemplo representativo de 3 ensayos independientes con 3 réplicas cada uno.

infectadas a 8 hpi, sin embargo a 16 hpi muestra un patrón agregado en la región donde se localiza la M^{pro}. Ambas proteínas, p62 y M^{pro}, muestran colocalización a 16 hpi, aunque es más evidente en aquellas células donde los parches de M^{pro} son muy compactos, indicando un estado de infección

muy avanzado. Al igual que ocurría en las células E.Derm, en estas células BEV induce la formación de autofagosomas a tiempos tardíos de infección. En la figura 35B, se observa una mayor acumulación de puntos de LC3 a 16 hpi con respecto al control sin infectar o a las células infectadas a 8 hpi,

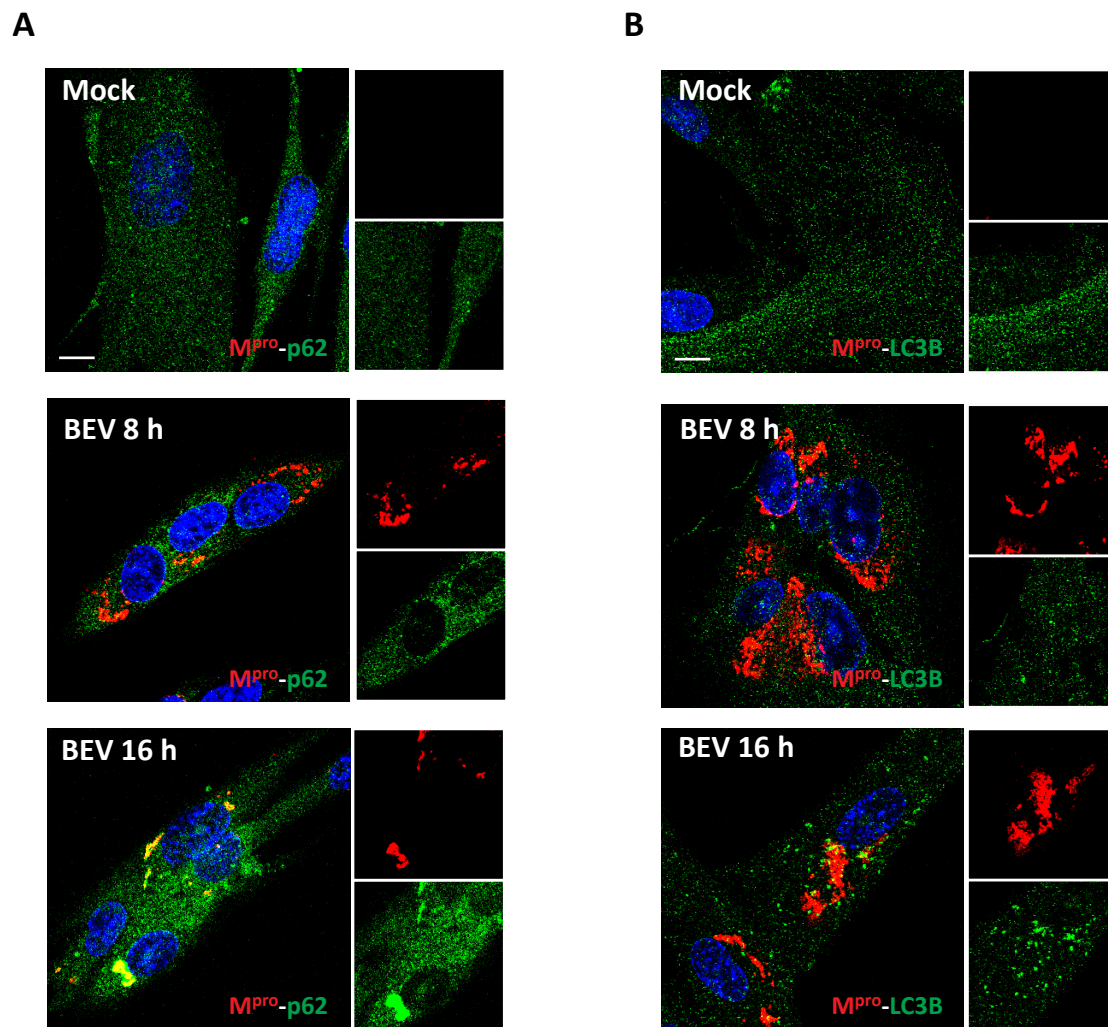


Figura 35: BEV induce autofagia selectiva. Análisis mediante inmunofluorescencia de células MRC5 infectadas con BEV o sin infectar (Mock), fijadas a 8 y 16 hpi. **A)** Coinmunomarcaje con anticuerpos específicos anti-M^{pro} (rojo), y frente a la proteína adaptadora p62 (verde). **B)** Coinmunomarcaje con anticuerpos específicos anti-M^{pro} (rojo), y frente a LC3 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Cada panel muestra una imagen ilustrativa del doble marcaje con una región representativa de cada señal por separado a su derecha. Barra 10 μm.

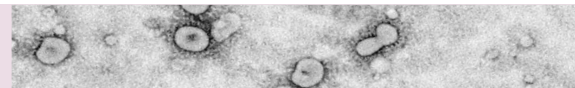
estando localizados en su mayoría rodeando a los parches de M^{pro}.

La colocalización de la proteína receptora p62 con la proteína M^{pro}, así como la presencia de LC3 rodeando a esta, nos hace pensar que BEV induce una autofagia selectiva. Estudios llevados a cabo por nuestro grupo muestran que BEV induce estrés de retículo a tiempos tardíos de infección (Nieves 2015. Datos sin publicar). Se ha documentado extensamente que la célula trata de resolver el problema del estrés de retículo marcando las proteínas o agregados causantes del estrés con

ubiquitina para ser posteriormente degradadas vía proteosoma. Ahora se conoce que la célula tiene una vía alternativa de degradación mediante autofagia selectiva (Lippai y col., 2014). Aunque se requiere un análisis más profundo, con los datos de que disponemos, pensamos que la gran acumulación de proteínas virales y agregados de las mismas a tiempos tardíos de la infección con BEV pueden ocasionar estrés de retículo, tratando la célula de escapar de este estrés mediante la inducción de autofagia selectiva.

O5

DISCUSIÓN



Los virus ssRNA⁺ se caracterizan por remodelar extensamente membranas celulares para formar sus complejos de replicación y transcripción. Estas estructuras membranosas, conocidas como factorías de replicación, sirven para concentrar todos aquellos componentes o macromoléculas requeridas durante la replicación, así como para proporcionar una separación física que protege al RNA viral, especialmente al dsRNA, del reconocimiento por parte de los sensores celulares implicados en los mecanismos de defensa antiviral de la célula huésped. Los torovirus son un grupo de virus entéricos emergentes pertenecientes al orden *Nidovirales* muy poco estudiados. Desde el aislamiento del primer torovirus en 1972 las escasas publicaciones disponibles se basan en su mayoría en estudios epidemiológicos. Sin embargo, poco se sabe sobre el ciclo de vida de estos virus, quedando prácticamente limitado su conocimiento a unos cuantos estudios preliminares sobre el proceso de morfogénesis (Garzon y col., 2006; Horzinek y col., 1984; Weiss y col., 1986) y algunos estudios sobre transcripción (de Groot y col., 2008; Smits y col., 2005; Smits y col., 2006; Snijder y col., 1990a; Snijder y col., 1990b; Snijder y col., 1990c).

En esta tesis doctoral nos propusimos estudiar los complejos de replicación y transcripción de los torovirus, concretamente de BEV, haciendo especial hincapié en la formación de las factorías replicativas de este virus. En primer lugar se obtuvieron anticuerpos policlonales frente a proteínas clave de la replicación viral, con los que se han localizado y caracterizado los RTCs de BEV a lo largo de la infección. Para ello se han empleado principalmente técnicas de microscopía óptica confocal y microscopía electrónica. En segundo lugar, se realizó un estudio más detallado a nivel ultraestructural sobre la biogénesis y la estructura de las factorías de replicación de estos virus, empleando para ello técnicas de microscopía electrónica convencional junto a técnicas que permiten hacer reconstrucciones 3D, como cortes seriados o tomografía electrónica.

Por último, los autofagosomas por su propia condición de vesículas de doble membrana han sido relacionados con las factorías replicativas de algunos virus ssRNA⁺, y por ello se ha estudiado el papel de la ruta autofágica sobre la replicación de BEV.

1. Caracterización de los RTCs de los torovirus

1.1 Presencia de DMVs en las células infectadas con BEV

Los primeros ensayos ultraestructurales realizados por técnicas de microscopía electrónica convencional mostraron la presencia de DMVs en el citoplasma de las células infectadas con BEV. Su formación es un proceso propio del virus, ya que no se observaron DMVs en las células sin infectar, y sin embargo si fueron localizadas en células E.Derm o MRC5 infectadas con BEV y procesadas bajo diferentes condiciones de preservación, como fijación química convencional o criofijación. Sorprendentemente, las DMVs no son claramente visibles bajo condiciones de criofijación y criosustitución, método previamente utilizado por Snijder y colaboradores para mejorar la preservación de las DMVs en células infectadas con SARS-CoV (Knoops y col., 2008; Snijder y col., 2006). El mismo grupo describió la presencia de DMVs en las células infectadas con el arterivirus EAV usando protocolos similares, aunque para los ensayos de tomografía electrónica mejoraron la preservación de las DMVs mediante la congelación a alta presión antes de la criosustitución (HPF-FS) (Knoops y col., 2012). El principal problema que encontramos en nuestro ensayo es el pobre contraste que muestran las membranas celulares, siendo prácticamente imposible visualizar las membranas que forman el RE, la membrana nuclear o las membranas de las mitocondrias, entre otras. Algunos estudios describen que las membranas biológicas, en particular las membranas del RE, no se contrastan adecuadamente bajo protocolos de

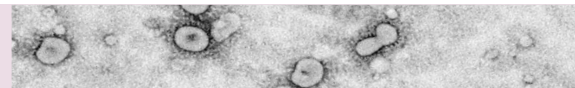
criosustitución debido a la excesiva extracción de lípidos que se puede producir durante el proceso (Giddings, 2003; Maneta-Peyret y col., 1999). A pesar de que se está consolidando el uso de técnicas de HPF-FS para mejorar la preservación de las DMVs (Limpens y col., 2011; Maier y col., 2013b; Romero-Brey y col., 2012), el protocolo de fijación química convencional utilizado en nuestros ensayos muestra una adecuada preservación de las estructuras celulares así como de las DMVs, las cuales aparentemente conservan la apariencia esférica previamente observada en otros nidovirus. No obstante, el interior de las DMVs presenta un aspecto algo cristalino, más acusado en las DMVs de mayor tamaño, que puede indicar una baja preservación del contenido de las mismas.

En las células infectadas con BEV los grupos de DMVs se observan rodeados de mitocondrias y RE, y en algunas ocasiones presentan conexiones entre las propias DMVs y las membranas del RE, característica que comparten con el resto de nidovirus. Además, aunque menos común, también observamos conexiones entre las DMVs y las membranas del RE asociadas a mitocondrias (MAMs). Recientemente, el grupo del Dr. Gastaminza (Friesland y col., 2013) ha sugerido que las membranas del MAM pueden servir de plataforma para iniciar la replicación del RNA viral durante la infección con HCV, virus que induce la formación de DMVs con características similares a las descritas para los nidovirus. La formación de las factorías de replicación viral a partir de las membranas del MAM es algo que se debe considerar y estudiar, ya que los virus, como parásitos intracelulares, necesitan la energía de la mitocondria para llevar a cabo sus procesos replicativos, y por lo tanto, el uso de las membranas del MAM puede proporcionar una plataforma para obtener energía de forma más eficiente al mantener las factorías virales asociadas a las mitocondrias. No obstante, para confirmar la implicación del MAM en la formación de las DMVs inducidas por BEV es imprescindible realizar análisis bioquímicos, ya que por microscopía

electrónica no se puede descartar la posibilidad de que las conexiones observadas entre las DMVs y las membranas del MAM simplemente reflejen el hecho de que el MAM es parte del RE, pero que este no cumpla una función específica en la formación de las factorías virales.

1.2 Relación entre las DMVs y los RTCs de BEV

Para analizar si las DMVs son el sitio donde transcurre la replicación y la transcripción viral, se generaron sueros policlonales específicos frente a la Hel, RdRp y M^{pro} de BEV, tres proteínas esenciales en la formación y funcionamiento de los RTCs. La utilización de estos sueros en inmunofluorescencia muestra un patrón de distribución subcelular de las nsps prácticamente idéntico entre ellas, con una señal específica en forma de pequeños puntos o parches dispersos por el citoplasma de la célula infectada a tiempos tempranos, que evolucionan para dar lugar a áreas mucho más densas localizadas en la región perinuclear de la célula a tiempos más tardíos de infección. Por inmunoblot, el suero anti-RdRp reconoce mayoritariamente una proteína de 100 kDa y otras de tamaño ligeramente superior que probablemente corresponden a intermediarios del proceso de maduración de la pp1ab. Se conoce muy poco sobre la maduración de las poliproteínas pp1a y pp1ab de torovirus, quedando su información limitada al estudio realizado por Smits y colaboradores (Smits y col., 2006) en el que se determinó la secuencia canónica de corte de la proteasa M^{pro} de BEV, y en base a esto, se propuso un modelo de procesamiento de las poliproteínas de BEV. A pesar de que el modelo no indica la presencia de un sitio de corte entre el dominio RdRp y el CPD, los propios autores sugieren la posibilidad de que exista una región de corte no canónica de la M^{pro}, o la actuación de una proteasa celular, para separar ambos dominios. Aunque se requieren ensayos más precisos sobre este corte, el reconocimiento de una proteína de 100 kDa por el suero anti-RdRp, correspondiente con el tamaño



teórico aproximado de la RdRp sin dominio CPD, apoyaría la hipótesis de un corte post-traducciona entre ambos dominios. Los sueros de la M^{pro}, por su parte, reconocen la proteína madura de 33 kDa así como la forma procesada de 16 kDa. Aunque, Smits y colaboradores (Smits y col., 2006) no observaron la forma procesada de 16 kDa en las células infectadas con BEV, si indicaron que existe una región canónica de corte (³³⁹⁴FATQ↓A³³⁹⁸) de la propia M^{pro} que dividiría la proteína en dos mitades de igual tamaño (~16 kDa). Además, estos autores describieron que la secuencia de corte interna está conservada en BToV. Tras el análisis de la secuencia de PToV comprobamos que esta secuencia interna también está conservada en la M^{pro} de este torovirus, indicando que la M^{pro} puede ser procesada en todos los torovirus, lo cual sugiere que probablemente tiene una función importante en el procesamiento de las poliproteínas pp1a/pp1ab. En este sentido, Smits y colaboradores sugirieron que el procesamiento interno que sufre la M^{pro} podría servir como mecanismo de autoregulación negativa, por el cual la M^{pro} se inactiva a sí misma. Las predicciones de estructura secundaria indican que la M^{pro} de BEV adopta una estructura secundaria similar a la de la proteasa principal del resto de nidovirus (Smits y col., 2006; Ulferts y col., 2011), con dos dominios catalíticos con forma de barril β, típico de proteasas tipo quimiotripsina como la proteasa 3C de picornavirus, y un tercer dominio hélice alfa de función desconocida. En este sentido, el procesamiento interno que sufre la M^{pro} de BEV ocurre cerca del residuo serina del segundo dominio catalítico, lo cual puede afectar a la estructura y a la actividad del mismo. De todas formas, a pesar de su proximidad al dominio catalítico, este corte podría ocurrir en una región sin consecuencias sobre la estructura de la M^{pro}, de tal forma que podrían permanecer unidas ambas unidades de 16 kDa manteniendo el dominio catalítico activo. Además, Smits y colaboradores, también especularon con la idea de que el procesamiento interno de la M^{pro} conduzca a

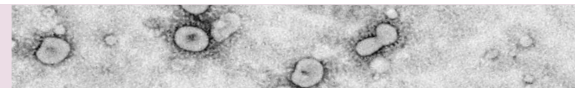
una vía alternativa de procesamiento de la pp1a/pp1ab. En este sentido, estudios con otros virus han demostrado que los cortes proteolíticos de una poliproteína ocurren a distinta tasa o velocidad de procesamiento, pudiendo ser favorecidas rutas alternativas de procesamiento en función de si se acumulan unos intermediarios u otros (Wassenaar y col., 1997). Como se observa en la figura 6B en las células infectadas con BEV la proteína de 16 kDa se acumula mayoritariamente en el intervalo de las 10-14 hpi y luego decae su acumulación, mientras que la forma de 33 kDa presenta su mayor acumulación entre las 14-20 hpi. Lo que puede estar ocurriendo es que a tiempos tempranos la secuencia de procesamiento interno de la M^{pro} esté accesible dando lugar a dos proteínas de 16 kDa, mientras que a medida que avanza la infección esta secuencia se puede ver menos favorecida, dando lugar a la acumulación de la forma de 33 kDa. A pesar de que la actividad de la forma de 16 kDa por sí sola no se ha demostrado, puede ocurrir que ambas formas, 16 kDa y 33 kDa, tengan actividad proteolítica por si solas pero actúen con distinta eficiencia o velocidad, propiciando un procesamiento diferencial de la poliproteína en función del tiempo.

Curiosamente, los sueros generados frente a la M^{pro} de BEV en rata o conejo presentan un reconocimiento diferencial de la proteína a pesar de haber sido generados a partir del mismo péptido sintético. Por una razón que desconocemos el suero generado en rata reconoce preferencialmente la proteína madura de 33 kDa, mientras que el suero de conejo reconoce preferencialmente la proteína procesada de 16 kDa. Por su parte el suero de la Hel, no mostró reactividad específica en los ensayos de inmunoblot.

Los análisis de microscopía confocal utilizando estos sueros muestran una clara colocalización entre las nsps, indicando que todas ellas están localizadas en la misma zona o región celular. De igual forma, el RNA de nueva síntesis se localiza en la región de las nsps, mostrando una gran colocalización con ellas

hasta aproximadamente las 14 hpi, momento a partir del cual la síntesis de RNA viral comienza a decaer. Sin embargo, el dsRNA, ampliamente utilizado como marcador de la replicación viral, solo muestra una colocalización parcial con las nsps. Ante este aparente conflicto, a partir de las imágenes de microscopía confocal se realizó una reconstrucción 3D del dsRNA y las nsps, en la que se observa que parte del dsRNA se localiza dentro de la masa formada por las nsps. En la misma línea, criosecciones de células infectadas con BEV e inmunomarcadas con los correspondientes anticuerpos muestran que las nsps de BEV están asociadas a las membranas de las DMVs o a las membranas adyacentes que forman la RVN, mientras que el dsRNA se localiza exclusivamente en el interior de la DMVs. La presencia del dsRNA en el interior de las DMVs puede indicar que este es el lugar donde ocurre la síntesis del RNA viral, sin embargo, la separación observada entre las nsps y el RNA de nueva síntesis con respecto al dsRNA plantea la duda de si realmente las DMVs son el lugar donde se lleva a cabo este proceso. De manera similar, la relación existente entre el sitio de acumulación del dsRNA y las nsps está cuestionada en el resto de nidovirus donde se ha estudiado (Hagemeijer y col., 2012; Knoops y col., 2008; Knoops y col., 2012; Maier y col., 2013b). Numerosas autores apuntan a que las DMVs deben de ser el lugar donde ocurre la síntesis de RNA en los nidovirus, pero la aparente separación entre las nsps y la mayoría del dsRNA, junto a la ausencia de poros que conecten el interior de las DMVs con el citoplasma, ha propiciado que se especule con varias hipótesis. Algunos autores proponen que las DMVs son estructuras no funcionales para la síntesis de RNA, las cuales actúan como estructuras de almacenaje del dsRNA, protegiendo al virus de la activación de los mecanismos de defensa de la célula (Hagemeijer y col., 2012). Como alternativa, proponen que las DMVs antes de estar cerradas, a tiempos tempranos de infección, son los sitios activos de síntesis de RNA, mientras que a tiempos más tardíos las DMVs permanecen

selladas actuando como vesículas de almacenaje. Otros autores, en cambio, apuntan a que las nsps se producen en exceso durante la infección viral, participando activamente en la síntesis del RNA viral solo una pequeña fracción de ellas (Knoops y col., 2008; Quinkert y col., 2005), y el resto permanecen acumuladas en las CM adyacentes a las DMVs. Otros incluso han llegado a plantear que la replicación ocurre sobre la membrana externa de las DMVs, aunque los ensayos de aislamiento de los RTCs y el tratamiento con nucleasas y proteasas muestran claramente que los RTCs y el RNA viral se encuentran protegidos por membranas (van Hemert y col., 2008a; van Hemert y col., 2008b). Al igual que en el resto de nidovirus, con BEV carecemos de una hipótesis clara, aunque pensamos que la replicación del RNA viral debe ocurrir en el interior de las DMVs. En este sentido, algunos autores que consideran que el RNA de nueva síntesis es un marcador exclusivo de replicación, descartan las DMVs como unidades replicativas basándose en que este colocaliza mayoritariamente con las nsps, las cuales están principalmente asociadas a las membranas adyacentes a las DMVs. Sin embargo, nuestros resultados indican que los sitios donde se detecta el RNA de nueva síntesis, además de zonas de replicación, también representan zonas activas de traducción, como se muestra en la figura 11 donde parte del RNA de nueva síntesis colocaliza con la proteína estructural M. De igual forma, las zonas de colocalización entre el RNA de nueva síntesis y las nsps, además de corresponder con zonas activas de replicación, también pueden representar zonas de traducción activa de nsps. En este trabajo hemos intentado llevar a cabo ensayos de colocalización entre el dsRNA y el RNA de nueva síntesis, pero los anticuerpos monoclonales anti-BrU probados no muestran una reactividad adecuada frente a la BrU (el anticuerpo utilizado anteriormente y mostrado en la figura 10 no se pudo usar ya que proviene de la misma especie que el anti-dsRNA). Ensayos similares con MHV (Hagemeijer y col., 2012) utilizando el análogo de



la uridina EU (5-Ethynyl uridine), muestran una aparente colocalización con el dsRNA pero solo a tiempos tempranos de infección. Además con el arterivirus EAV (Knoops y col., 2012) también se ha descrito colocalización entre las nsps y el dsRNA a tiempos tempranos de infección. En este sentido, con BEV no hemos observado colocalización entre el dsRNA y las nsps a tiempos tempranos de infección, quedando restringidas ambas señales a una colocalización parcial similar durante toda la infección.

1.3 Los RTCs están separados del sitio de ensamblaje viral

La caracterización previa de las proteínas estructurales de BEV realizada por nuestro laboratorio (Garzon y col., 2006), mostró que estas proteínas se acumulan en la región perinuclear de la célula, concretamente en las membranas del ERGIC, donde tiene lugar el ensamblaje del virus. Sin embargo, aunque los RTCs también se localizan cerca de la región perinuclear, los ensayos de microscopía confocal muestran una completa separación entre las proteínas M y M^{pro} a lo largo de la infección. Además, tampoco se observa colocalización entre la M^{pro} y la proteína p53 del ERGIC. Estos resultados, sumados a resultados previos del laboratorio en los que se vio que las proteínas estructurales M y S colocalizan entre sí a lo largo de la infección, y sin embargo no lo hacen con el dsRNA (Garzón y colaboradores; datos no publicados), indican que los sitios de replicación y transcripción de BEV están separados de los sitios de ensamblaje del virus. Los ensayos ultraestructurales también avalan esta conclusión, ya que en ellos se observa que la mayoría de las partículas virales están localizadas en el interior de vesículas separadas físicamente de los sitios donde se localizan las DMVs. En SARS-CoV también se ha descrito la completa separación entre ambos procesos (Snijder y col., 2006), sin embargo, se ha sugerido que la proteína estructural N puede tener algún papel en los estadios tempranos de la síntesis de RNA de los nidovirus (Almazan y col., 2004;

McBride y col., 2014). Además, se ha observado colocalización entre las nsps y la proteína N a tiempos tempranos de infección (Knoops y col., 2012; Verheije y col., 2010). Ensayos preliminares de microscopía confocal muestran que la proteína N de BEV forma agregados que colocalizan con la proteína M^{pro} a 6hpi (datos no mostrados), lo que podría indicar que la proteína N de BEV también cumple un papel en la replicación y transcripción de este virus, aunque se requieren más ensayos para analizar esta posibilidad.

1.4 Origen de las membranas asociadas a los RTCs

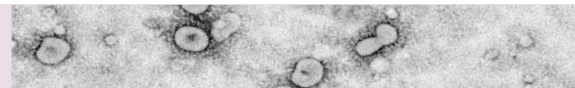
Durante este estudio se han llevado a cabo ensayos de microscopía confocal utilizando marcadores específicos de diferentes orgánulos de la célula con el objetivo de tratar de determinar el origen membranoso de las DMVs. Sin embargo, ninguno de los marcadores utilizados muestra una clara colocalización con las nsps. No obstante, los marcadores del RE, PDI y calnexina, así como S1R y la sonda mitotracker que marcan el MAM y las mitocondrias, respectivamente, presentan una señal que rodea o que colocaliza parcialmente con la proteína M^{pro}. Estos resultados están en concordancia con los observados en los estudios ultraestructurales, donde las DMVs se observan rodeadas por RE y mitocondrias, y en ciertas ocasiones se observan conexiones puntuales entre ellas y el ER o el MAM. Como discutiremos posteriormente, los estudios 3D confirman que las DMVs y la red membranosa que las integra derivan de membranas pareadas procedentes del colapso del RE, y por lo tanto asumimos que este es el órgano donante de las membranas de las DMVs. De manera similar a BEV, el origen membranoso de la RVN inducida por los *Coronavirus* también está en cuestión, ya que aparentemente, de acuerdo a los ensayos de tomografía electrónica 3D, utilizan las membranas del RE (Knoops y col., 2008), pero la ausencia de marcadores tradicionales de RE en sus membranas (Snijder y col., 2006; Ulasli y col., 2010) dificulta la comprensión de su biogénesis.

De todas formas, la propia complejidad de la estructura membranosa inducida por BEV podría explicar la ausencia de marcadores tradicionales del RE en la misma. Basándonos en el modelo de formación de DMVs propuesto para BEV (esquema 7), el cual se discute más adelante, podemos sugerir que la propia acumulación de nsps, que da lugar al colapso del RE y a la formación de la membrana pareada, puede excluir a las proteínas tradicionales de RE. Otra opción, igual de válida, implicaría la formación de la membrana pareada en regiones del RE con características especiales, que carezcan de los marcadores tradicionales del RE. En este sentido, numerosos estudios indican que el RE tiene dominios específicos con diferentes funciones, e incluso con distinta composición lipídica y proteica, como el MAM o el RE asociado a degradación (ERAD) (Lynes y col., 2011). El MAM tiene dominios ricos en colesterol que sirven para reclutar proteínas específicas a este dominio, y por lo tanto podrían servir para anclar los RTCs. En este sentido, algunos estudios indican que los virus promueven el reclutamiento de proteínas como la quinasa PI4K (*phosphatidylinositol 4-kinase*) para producir membranas enriquecidas en fosfatidilinositol 4-fosfato que sirven de plataforma para reclutar proteínas celulares importantes en la replicación viral, así como para sustentar los propios RTCs (Delang y col., 2012; Hsu y col., 2010; Popescu y col., 2014). Por otra parte, también se ha propuesto que regiones específicas del RE enriquecidas en PI3P, conocidas como omegasomas (Axe y col., 2008; Lu y col., 2011), sirven para reclutar las proteínas implicadas en la formación de los autofagosomas. De igual forma, las membranas del omegasoma podrían servir de plataforma para reclutar las proteínas necesarias en la formación de las DMVs, las cuales, por su propia naturaleza de vesículas de doble membrana, han sido relacionadas con los autofagosomas. Por ello, durante los estudios para determinar el origen membranoso de las DMVs se incluyó el marcador de autofagosoma LC3B. A pesar de que la proteína LC3 no muestra colocalización con la M^{pro} de BEV,

si se observa su redistribución a tiempos tardíos de infección, lo cual es indicativo de la activación de la ruta autofágica. Como discutiremos más adelante, BEV activa la ruta autofágica a tiempos tardíos. Aunque los distintos análisis llevados a cabo indican que esta ruta no es necesaria para el ciclo infectivo de BEV, no podemos descartar que las DMVs inducidas por la infección se generen a partir de las membranas del omegasoma. Algunos autores han demostrado la formación de la membrana del omegasoma en células carentes de LC3 (Itakura y col., 2010). Otro dominio del RE que se ha visto relacionado con la formación de las factorías virales ha sido el ERAD. En algunos nidovirus se ha observado colocalización entre los RTCs y algunos factores del ERAD como EDEM1 y OS-9 (Monastyrska y col., 2013; Noack y col., 2014). La observación previa de que EDEM1, así como otros factores del ERAD, son reciclados a través de vesículas derivadas del RE recubiertas de LC3I (EDEMosomas) (Bernasconi y col., 2011; Cali y col., 2008), sirvió de base para proponer a estas estructuras como plataforma para la replicación y transcripción de los nidovirus (Reggiori y col., 2010). Nosotros hemos tratado de comprobar esta hipótesis en la infección con BEV, pero los análisis por microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos frente a EDEM1 y OS-9 no fueron concluyentes. No obstante, podemos descartar la implicación de los EDEMosomas en la replicación de BEV, al comprobar que el virus replica eficientemente en células carentes de la proteína LC3.

1.5 Caracterización de los RTCs del torovirus bovino Aichi

Durante este estudio se ha llevado a cabo una pequeña caracterización de los RTCs del torovirus bovino Aichi. Cabe destacar que es el primer estudio realizado sobre el ciclo infectivo de un torovirus distinto a BEV, pudiendo ser la base para la utilización de este virus en posteriores ensayos que traten de estudiar la biología de estos virus.



Dado que existe una gran homología de secuencia entre los torovirus (entorno al 80 % en secuencia nucleotídica) se utilizaron los sueros frente a las proteínas virales de BEV para detectar las proteínas de Aichi, pudiendo detectar mediante inmunoblot las proteínas N y M de este virus, así como la M^{pro} en sus dos formas de 33 kDa y 16 kDa. Además, los ensayos de colocalización muestran que al igual que en BEV, las nsps de este virus se localizan en la misma zona formando grandes parches o agregados cerca de la región perinuclear de la célula. De manera similar, también se ha incluido un suero frente a la proteasa PLP del torovirus bovino BRV, el cual reconoce una proteína de 70 kDa, que en ensayos de inmunofluorescencia muestra una gran colocalización con el resto de nsps.

No obstante, lo verdaderamente importante es la presencia de DMVs en las células infectadas con el torovirus Aichi. Las características de estas DMVs son muy similares a las de BEV, mostrando grupos de DMVs rodeados de mitocondrias y del RE. Además, también se observan largas membranas pareadas entre las DMVs, que por su similitud con las observadas en la RVN inducida por BEV pensamos que pueden formar parte de una RVN inducida por Aichi.

En conjunto, la presencia de grupos de DMVs en el citoplasma de células infectadas con los torovirus Aichi y BEV demuestra que la formación de DMVs es un hecho característico y común dentro del género *Torovirus*.

2. Biogénesis y estructura de la RVN

2.1 Estructuras membranosas inducidas por la replicación de BEV

Los estudios ultraestructurales llevados a cabo a lo largo de la infección se diseñaron pensando en cubrir el proceso de replicación de BEV, con un tiempo temprano de 6 hpi donde los RTCs comienzan a formarse, un tiempo

intermedio de 10 hpi donde la replicación está a pleno rendimiento, y un tiempo tardío de 16 hpi donde la síntesis de RNA ha finalizado o está finalizando. Como se muestra en las diferentes imágenes y figuras de este estudio, BEV induce una gran remodelación de membranas, basada fundamentalmente en la formación de DMVs. Como era de esperar el número de DMVs incrementa a medida que avanza la infección, mientras que su localización varía desde pequeños grupos de DMVs dispersos por el citoplasma a tiempos tempranos, a complejos grupos de DMVs reunidos cerca de la región perinuclear a tiempos más avanzados. Ambas características fueron previamente descritas al estudiar por microscopía confocal la distribución de las nsps a lo largo de la infección, reforzando la observación de que los RTCs de BEV se localizan en la región de las DMVs. Sorprendentemente se observa que el volumen de las DMVs disminuye a medida que avanza la infección, presentando un diámetro interno promedio de 153 ± 53 nm a 6 hpi, 111 ± 36 nm a 10 hpi y 68 ± 26 nm a 16 hpi. Tras comparar con el resto de nidovirus estudiados, concluimos que esta característica es única y no ha sido descrita hasta la fecha. Los coronavirus, SARS-CoV, MHV e IBV (Knoops y col., 2008; Maier y col., 2013b; Ulasli y col., 2010) inducen DMVs con un diámetro de 200-300 nm, mientras que en el arterivirus EAV son algo menores, induciendo DMVs de 100 nm de diámetro a lo largo de la infección (Knoops y col., 2012). Como ya se indicó en el apartado de resultados, una disminución en el volumen medio de las DMVs a lo largo de la infección no implica directamente una disminución del volumen de las DMVs previamente formadas. En este sentido, nuestra hipótesis es que a medida que avanza la infección el volumen de las DMVs recién formadas es menor, y por lo tanto, varía la proporción de DMVs de gran tamaño frente a las de menor tamaño a lo largo de la infección. Aunque no disponemos de base molecular para demostrarlo, pensamos que el diámetro de las DMVs depende de la cantidad de nsps acumuladas. Si asumimos

que las nsps son las responsables de colapsar el RE e inducir la curvatura de la membrana resultante (esquema 7), podemos especular que a tiempos tempranos en los que hay poca cantidad de nsps, éstas se localizan más dispersas necesitando mayor longitud de membrana pareada para formar la DMV. Sin embargo, a tiempos tardíos en los que las nsps están muy acumuladas, éstas estarán más próximas y por lo tanto requieren menos membrana pareada para completar la DMV. Además, estudios recientes indican que no existe correlación entre el tamaño de las DMVs y su capacidad replicativa (Al-Mulla y col., 2014).

Aparte de DMVs, también se observan largas membranas pareadas intercaladas entre las DMVs, las cuales son visibles a tiempos tempranos, aunque su presencia se hace más patente a medida que avanza la infección, al igual que su aspecto se hace más curvado. Como posteriormente se discutirá, las membranas pareadas están conectadas con la membrana externa de las DMVs, así como con el RE, formando parte de toda una red de membranas. De manera similar a BEV, en EAV también se ha descrito la presencia de membranas pareadas que conectan las DMVs con el RE (Knoops y col., 2012). Además, recientemente con el coronavirus IBV se ha mostrado la presencia de membranas *zippered* (Maier y col., 2013b), que también derivan del colapso del RE y cuya apariencia no difiere de la de las membranas pareadas. Sin embargo, las membranas *zippered* no muestran conexiones con las DMVs, mientras que si lo hacen con las esférulas inducidas por IBV. Nuestros ensayos de microscopía electrónica convencional muestran la presencia de estructuras curvadas con gran parecido con las esférulas inducidas por IBV (Maier y col., 2013b), sin embargo, como discutiremos más adelante, los ensayos tridimensionales descartan que las estructuras observadas en las células infectadas con BEV sean verdaderas esférulas.

Curiosamente, las típicas CM descritas en algunos coronavirus, principalmente en los miembros del género *betacoronavirus*, no se

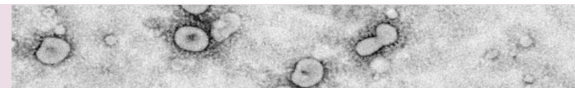
observan entre la red membranosa inducida por BEV. A pesar de que la apariencia de las CMs es muy distinta a la de las membranas pareadas observadas en BEV, pueden ser estructuras similares basadas en largas membranas pareadas que tienden a curvarse a medida que avanza la infección. En este sentido, el tamaño de las CMs aumenta y son más aparentes con el transcurso de la infección (Ulasli y col., 2010), y aunque no está claro si son estructuras membranosas simples o dobles, los diferentes estudios las describen como marañas de membranas próximas al RE y a las DMVs, que presentan conexiones con ambas estructuras.

En MHV también se ha descrito la presencia de membranas cúbicas o cuerpos tubulares (Ulasli y col., 2010), aunque estas son estructuras típicas de tiempos tardíos de infección cuya función no está clara. Sin embargo en la infección con BEV no se ha observado este tipo de formaciones. Otras estructuras descritas tanto a partir de células infectadas con MHV como con SARS, son las grandes vacuolas que contienen viriones en su interior. BEV también induce la formación de estas vacuolas, que se localizan en las cercanías de los grupos de DMVs pero separadas físicamente de estos. Se piensa que estas vacuolas actúan como vesículas de secreción que se funden con la membrana plasmática para liberar las partículas virales al medio extracelular.

2.2 BEV induce la formación de una red reticulovesicular

Los análisis 3D de las factorías de replicación inducidas por BEV demuestran que las DMVs no son entidades aisladas en el citoplasma de la célula infectada, sino que forman parte de una gran red de membranas derivadas del RE conocida como RVN, la cual está formada por una gran cantidad de DMVs conectadas entre sí a través de su membrana externa, y con membranas pareadas que derivan del RE.

La primera aproximación válida se realizó utilizando cortes seriados de 50 nm de grosor en



células infectadas con BEV a 6 hpi. Se obtuvieron imágenes de varias series, como la mostrada en la figura 28, observándose en todas ellas que las DMVs forman parte de una red membranosa que ocupa un gran volumen en la célula infectada. Además, se observa muy bien la formación de la membrana pareada a partir de colapso del RE, mostrando largas membranas pareadas con conexiones puntuales con la membrana externa de las DMVs. Aunque se ha generado una reconstrucción 3D a partir de estas imágenes, esta no se ha mostrado debido a que presenta una apariencia muy artificial que puede desvirtuar el resultado. Como ya se indicó en el apartado de resultados, el pequeño tamaño de las DMVs a 10 y 16 hpi impide la aplicación de esta técnica al no permitir el seguimiento de las membranas de las DMVs entre cortes consecutivos.

Como segunda aproximación se aplicaron técnicas de tomografía electrónica, las cuales han permitido tener una imagen más fidedigna de las factorías de replicación inducidas por BEV, gracias a las reconstrucciones 3D derivadas de estos estudios. Ambas técnicas, cortes seriados y tomografía, son muy interesantes y complementarias para la realización de estos estudios. Por un lado, la tomografía aporta una imagen 3D muy real de la factoría de replicación, pero presenta el inconveniente de estar limitado el volumen de estudio por el tamaño de los cortes con los que se trabaja (≈ 300 nm). Sin embargo, los análisis por cortes seriados permiten tener una visión más general de la estructura, al poder observar un mayor volumen de la misma, aunque por el contrario, perdemos mucho detalle al no disponer de la información entre los cortes consecutivos.

Gracias a los ensayos de tomografía se han obtenido tres reconstrucciones representativas de las factorías de replicación de BEV a 6, 10 y 16 hpi. Los tres modelos confirman la formación de una RVN, donde las DMVs están conectadas entre sí por su membrana externa, a través de conexiones puntuales con largas paredes o láminas de

membranas pareadas. En términos generales, la estructura membranosa inducida por BEV es similar a lo largo del tiempo, con la salvedad de que el número de DMVs y la proporción de DMVs pequeñas con respecto a las grandes se ve incrementada, así como las membranas pareadas aumentan su longitud y complejidad.

2.3 ¿BEV induce la formación de verdaderas esférulas?

Los ensayos de microscopía electrónica 2D mostraron la presencia a tiempos tardíos de membranas pareadas con invaginaciones que recuerdan mucho a las esférulas previamente descritas para el coronavirus IBV (Maier y col., 2013b). Sin embargo, los estudios por tomografía descartan la formación de verdaderas esférulas en la RVN inducida por BEV. A pesar de mantener un aspecto de esférula en las imágenes 2D de los tomogramas, la reconstrucción muestra que más bien son invaginaciones incompletas de la membrana pareada. Basándonos en el modelo propuesto para la formación de las DMVs (Esquema 7), pensamos que las invaginaciones incompletas observadas a tiempos tempranos pueden ser un paso intermedio en la formación de las DMVs. Sin embargo, estas estructuras son mucho más visibles a tiempos tardíos en los que la complejidad de las membranas pareadas es muy alta, y donde prácticamente ya ha concluido la síntesis de RNA. Nuevamente, si nos basamos en el modelo propuesto para la formación de las DMVs, y asumimos que las nsps son las responsables de colapsar el RE e inducir la curvatura de la membrana resultante, puede ocurrir que la propia interacción entre las nsps propicie la formación de membranas con forma de rizo en vez de DMVs a tiempos tardíos, en los que la acumulación de nsps es desproporcionada. Por lo tanto, pensamos que las complejas membranas pareadas observadas a tiempos tardíos son más bien estructuras aberrantes del proceso de formación de las DMVs, fruto de la gran acumulación de nsps en estas membranas.

2.4 ¿Las DMVs son estructuras abiertas?

Una cuestión importante aún sin resolver es la ausencia de poros que conecten el interior de las DMVs con el citoplasma. Los tomogramas de BEV muestran la presencia de estructuras en forma de poros en las DMVs a 6hpi, sin embargo no queda lo suficientemente probado que sean verdaderos poros, ya que no se observa un canal que conecte el interior de la DMV con el citoplasma. Una estructura similar fue descrita en los estudios tridimensionales llevados a cabo con el arterivirus EAV (Knoops y col., 2012), pero al igual que en nuestro caso no queda demostrado que sean estructuras con función de poro. La ausencia de poros suscita una gran controversia, ya que las DMVs, como unidades replicativas, deben tener un sistema que permita el intercambio de material entre su interior y el citoplasma, de tal forma que los sustratos necesarios para la síntesis del RNA estén accesibles en el interior de la DMVs y el RNA de nueva síntesis tenga salida hacia el citoplasma. En este sentido, puede ocurrir que los poros o canales existan pero no sean visibles a la resolución actual de los tomogramas. Además, no se puede descartar la implicación de complejos proteicos que favorezcan el intercambio de material entre el interior y el exterior de la DMVs, no visibles en los tomogramas.

2.5 Modelo de formación de la RVN de BEV

El modelo que proponemos para la formación de las DMVs y la RVN inducida por BEV se ilustra en el esquema 7, y está basado en el modelo propuesto para EAV por Pedersen y colaboradores (Pedersen y col., 1999). En él, la interacción entre las nsps virales sintetizadas en el RE ocasiona el colapso del lumen del retículo y la invaginación del mismo, dando lugar a la formación de las membranas pareadas. La acumulación de nsps hace que la invaginación crezca llegando un momento en el que los extremos se aproximan y se fusionan para dar lugar a la formación de una DMV. A su vez, la formación de varias DMVs a

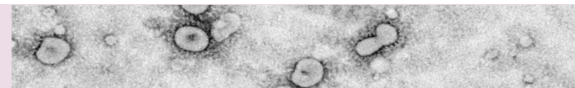
partir de la misma membrana pareada da lugar a la formación de la RVN. Pensamos que todos estos procesos son ocasionados principalmente por la acumulación de nsps en las membranas del RE, especialmente de los dominios TM, los cuales se ha visto que por sí solos son capaces de formar estructuras como las DMVs en *Coronavirus* (Angelini y col., 2013) y *Arterivirus* (Posthuma y col., 2008; Snijder y col., 2001).

Los resultados obtenidos con BEV, como miembro del género *Torovirus*, junto a los previamente obtenido en *Coronavirus* y *Arterivirus* (Knoops y col., 2008; Knoops y col., 2012; Maier y col., 2013b; Ulasli y col., 2010), avalan la hipótesis de una estructura común de las factorías de replicación y transcripción de todos los miembros del orden *Nidovirales* basada en la formación de una RVN de DMVs conectadas entre ellas por membranas pareadas que derivan del colapso del RE. En los últimos tiempos se ha puesto especial énfasis en el estudio de las factorías de replicación de los virus, ya que defectos en su formación tienen consecuencias negativas para la síntesis del RNA. En estudios recientes se ha descrito la efectividad de moléculas inhibitoras capaces de interactuar con los RTCs impidiendo la formación de las DMVs (Chatterji y col., 2015; Lundin y col., 2014), y por tanto, bloqueando la replicación viral. En este sentido, es importante conocer bien las factorías de replicación viral para poder desarrollar compuestos antivirales dirigidos frente a estas estructuras.

3. Estudio de la autofagia inducida por BEV

3.1 BEV induce la activación de la ruta autofágica

Los diferentes ensayos llevados a cabo para estudiar la ruta autofágica muestran claramente que BEV induce su activación a tiempos tardíos



de infección. En este sentido, se ha visto que BEV promueve la conversión de la proteína LC3 I en beneficio de su forma lipidada LC3II a tiempos tardíos de infección (16 y 24 hpi). De igual forma, bajo la infección con BEV la proteína heteróloga GFP-LC3 se redistribuye desde su forma difusa citoplasmática (GFP-LC3 I) al característico patrón punteado en autofagosomas (GFP-LC3II). Además, se ha comprobado que la activación de la autofagia en las células infectadas con BEV no es un mecanismo desencadenado por la entrada del virus, sino que requiere de una replicación activa, ya que virus inactivados por luz ultravioleta no son capaces de inducir la conversión de LC3 I a LC3II.

Un punto importante a tener en cuenta al estudiar la ruta autofágica es que un incremento en la cantidad de autofagosomas no implica directamente una activación de la ruta autofágica, ya que la inhibición del flujo autofágico a nivel de degradación de autofagosomas produce el mismo efecto. Durante este estudio se ha analizado el estado del flujo autofágico en las células infectadas con BEV, utilizando para ello la construcción mCherry-GFP-LC3, lo cual nos ha permitido comprobar que la autofagia inducida por BEV mantiene un flujo autofágico activo, en el que los autofagosomas son generados y degradados siguiendo el ciclo normal de la ruta.

3.2 La modulación de la ruta autofágica no causa efecto sobre la infección de BEV

Durante este estudio se han realizado diferentes abordajes encaminados todos ellos a modular la ruta autofágica con el objetivo de determinar el papel que cumple esta ruta en la infección con BEV. Sin embargo, la activación de la ruta autofágica tras someter a las células a ayuno, o su inhibición tras pretratar farmacológicamente las células con inhibidores de la formación o de la degradación de los autofagosomas, no parece tener efecto sobre la producción de virus. De igual forma, el silenciamiento de proteínas diana para la ruta autofágica como Beclin 1 o LC3B tampoco produce efecto alguno sobre la producción de

BEV. Además el bloqueo del flujo autofágico con agentes que bloquean la degradación de los autofagosomas, como HCQ y NH_4Cl , durante la fase de replicación activa, o en la de máxima liberación de virus, tampoco causa cambios importantes sobre la producción de BEV. En conjunto, todos los resultados obtenidos muestran que BEV induce autofagia a tiempos tardíos de infección, pero esta no es necesaria para el funcionamiento del ciclo infectivo de BEV.

Nuevamente, al igual que en *Torovirus*, miembros destacados de los géneros *Coronavirus* y *Arterivirus* son capaces de inducir autofagia aunque esta parece que no es necesaria para la replicación de estos virus (Maier y col., 2012). A pesar de ello, algunos autores muestran colocalización entre la proteína LC3 y las nsps o el dsRNA viral, sugiriendo que la proteína LC3 tiene un papel independiente de autofagia en la replicación viral (Iryna Monastyrska, 2013; Reggiori y col., 2010). En este sentido, nuestros resultados indican que en las infecciones con BEV no existe colocalización entre la proteína LC3 endógena y las nsps, así como tampoco con la proteína GFP-LC3 expresada heterológicamente. Por otra parte, la señal punteada del dsRNA observada en las infecciones con BEV es muy parecida a la señal que muestra la proteína LC3 cuando la ruta autofagica está activa, sin embargo, ensayos recientes de colocalización entre el dsRNA y la proteína endógena LC3 o la proteína GFP-LC3 muestran que ambas proteínas se localizan separadas (resultados no mostrados). Además, como se indicó anteriormente, el virus es capaz de replicar eficientemente en ausencia de la proteína LC3, lo que descarta un papel independiente de autofagia de esta proteína bajo la infección con BEV.

3.3 ¿Qué papel cumple la ruta autofágica en la infección con BEV?

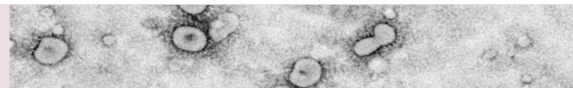
Valorando en su conjunto los resultados obtenidos al analizar la ruta autofágica en células infectadas con BEV, pensamos que la activación de esta ruta por BEV es un mecanismo antiviral

desencadenado por la propia célula para combatir la infección. Sin embargo, esta activación se desencadena a tiempos tardíos de infección en los que la mayoría del virus ya se ha liberado, teniendo un efecto mínimo o nulo sobre la infección de BEV, como demuestra la ausencia de diferencias en la producción de virus extracelular cuando se modula la ruta autofágica.

Cada vez hay más evidencias de que la autofagia es un proceso altamente selectivo en el que proteínas receptoras de carga, como la proteína p62, actúan reclutando selectivamente agregados de proteínas mal plegadas, orgánulos dañados y parásitos intracelulares entre otros, para ser cargados en vesículas autofágicas. En la infección con BEV, la proteína M^{pro} y la proteína de carga p62 colocalizan a tiempos tardíos de infección, estando ambas proteínas localizadas en la región perinuclear de la célula formando grandes agregados o parches que a su vez están rodeados por la proteína LC3. A pesar de que se requieren más ensayos, este resultado puede indicar que la infección con BEV desencadena un proceso de autofagia selectiva a tiempos tardíos de infección en el que las proteínas virales son el sustrato a degradar. Estudios recientes de nuestro grupo muestran que la infección con este virus también induce estrés de retículo a tiempos tardíos de infección (Nieves 2015. Datos sin publicar), lo que nos hace pensar que este puede ser el desencadenante de la autofagia selectiva observada. La célula responde a un estrés de retículo, provocado por la acumulación de proteínas mal plegadas, a través de la activación del sistema ERAD, el cual promueve la ubiquitinación de estas proteínas para su degradación vía proteosoma (Christianson y col., 2014; Ruggiano y col., 2014). Se sabe que cuando el proteosoma está saturado por un exceso de proteínas ubiquitinadas se promueve la degradación de proteínas mal plegadas vía autofagia. Estudios recientes sugieren que además la autofagia actúa eliminando de forma eficiente proteínas mal plegadas que forman agregados o que por su estructura no pueden

ser correctamente procesadas por la maquinaria canónica del ERAD (Houck y col., 2014; Shaid y col., 2013).

Además de estrés de RE, estudios de nuestro laboratorio indican que a tiempos tardíos de infección (desde las 16 hpi) las células equinas infectadas con BEV sufren un proceso de desregularización que desemboca al final en la activación del proceso de muerte celular programada o apoptosis (Maestre y col., 2011). Análisis mediante marcaje metabólico muestran una inhibición generalizada de la síntesis de proteínas en las células infectas con BEV, tanto a nivel de proteínas celulares como virales, a partir de las 16 hpi. Un mecanismo común en la inhibición de la síntesis de proteínas durante el proceso de apoptosis es la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α , el cual sabemos que en las infecciones con BEV permanece fosforilado desde las 8 hpi en adelante (Maestre y col., 2011). Aunque no está claro el mecanismo de actuación, se sabe que la fosforilación de eIF2 α conlleva la activación de la ruta autofágica. Se conocen cuatro quinasas responsables de la fosforilación del factor eIF2 α , sin embargo solo las quinasas PKR y PERK han sido relacionadas con la inducción de la ruta autofágica (Kouroku y col., 2006; Tallozy y col., 2002). Estudios de nuestro laboratorio muestran que la activación de la proteína PKR se correlaciona con la fosforilación del factor eIF2 α en las células infectadas con BEV (Maestre y col., 2011). En el caso de PERK, aunque no se ha analizado directamente la activación de esta quinasa, se sabe que su activación ocurre en condiciones de estrés de retículo como las inducidas por BEV. A tiempos tardíos de infección, BEV promueve la maduración del factor XBP-1, el cual se sabe que se transloca al núcleo para activar la expresión de chaperonas o proteínas implicadas en el ERAD (Nieves 2015. Datos sin publicar). Además, análisis muy recientes de nuestro laboratorio muestran que la inhibición de las quinasas PKR o PERK utilizando los inhibidores específicos C16 (imidazol-oxindol) o C38 (indolina), respectivamente, es capaz de



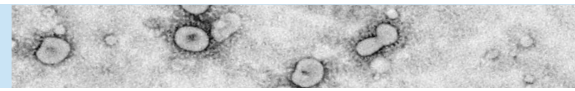
revertir la inhibición de la síntesis de proteínas que se produce a tiempos tardíos, y disminuye la apoptosis observada a estos tiempos. Estos datos sugieren que la inducción de la autofagia observada en células infectadas con BEV podría ser fruto de la fosforilación del factor eIF2 α por PKR o PERK. En este sentido, resultados recientes nos han permitido comprobar que la inhibición de estas quinasas produce una reducción del proceso autofágico, como queda patente por la reducción de la conversión de LC3 I a LC3II en las células infectadas con BEV en presencia de los inhibidores de las proteínas PKR y PERK (resultados no mostrados).

En general, parece que tanto la autofagia como la apoptosis previamente observada en las células infectadas con BEV son consecuencia de un

mecanismo antiviral desencadenado por la célula para hacer frente a la infección. Probablemente, aunque el virus trata de ocultar la infección a la célula, a tiempos tardíos de infección existe una desregulación generalizada promovida por la gran acumulación de proteínas virales, que provoca la activación de los procesos antivirales. Posiblemente, para solucionar este problema, la célula responde disparando el mecanismo de estrés de retículo y la autofagia, pero al no poder solventarlo, termina desencadenando apoptosis. De todas formas, aunque aparentemente estamos ante un mecanismo negativo para el virus, no podemos descartar que evolutivamente el virus mantenga un sistema que le permita activar estas repuestas antivirales a tiempos tardíos en los que ya se ha producido la progenie viral, que le sirvan para su diseminación *in vivo*.

O6

CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos durante esta tesis se proponen las siguientes **conclusiones**:

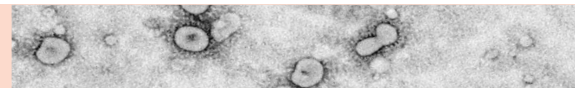
1. Los torovirus inducen la formación de DMVs en el citoplasma de las células infectadas para anclar sus RTCs, y llevar a cabo los procesos de replicación y transcripción viral.
2. Las nsps, como parte de los RTCs, están asociadas a las membranas de las DMVs y a las membranas adyacentes que las rodean, mostrando una gran colocalización entre ellas, así como con el RNA de nueva síntesis, a lo largo de la infección. Sin embargo, el dsRNA solo colocaliza parcialmente con las nsps, permaneciendo restringida su señal al interior de las DMVs, lugar donde probablemente transcurre la replicación y transcripción viral.
3. Los sitios de replicación y transcripción de BEV están separados de los sitios de ensamblaje del virus.
4. Los análisis ultraestructurales señalan al RE como orgánulo donante de la membrana a partir de la cual se forman las DMVs, aunque los marcadores tradicionales de retículo, PDI y calnexina, no muestran colocalización con las nsps.
5. Los estudios tridimensionales muestran que las DMVs inducidas por BEV no son entidades aisladas en el citoplasma de las células infectadas, sino que forman parte de una compleja red reticulovesicular de membranas. Estos estudios indican que las membranas del RE se colapsan dando lugar a la formación de membranas pareadas, las cuales a su vez se curvan para dar lugar a la formación de las DMVs.
6. A pesar de que los estudios ultraestructurales 2D mostraron la presencia de estructuras con morfología de esférula a tiempos tardíos de infección, los estudios de tomografía electrónica descartan la presencia de verdaderas esférulas en la RVN inducida por BEV, indicando que las estructuras previamente observadas pueden corresponder a invaginaciones incompletas de la propia membrana pareada a la que están unidas.
7. La ruta autofágica está activada durante la infección con BEV, manteniendo un flujo activo a tiempos tardíos de infección. Sin embargo, la modulación de la ruta autofágica mediante la activación o inhibición de la formación de autofagosomas, o el bloqueo de la degradación de los mismos, no causa efecto sobre la producción de virus infeccioso.
8. La colocalización de la proteína receptora p62 con la proteína M^{pro} de BEV, así como la presencia de LC3 rodeando a esta a tiempos tardíos de infección, nos hace pensar que la autofagia observada en las células infectadas con este virus es una autofagia selectiva desencadenada por la propia célula para tratar de eliminar el exceso de proteínas virales producidas a estos tiempos.



REFERENCIAS

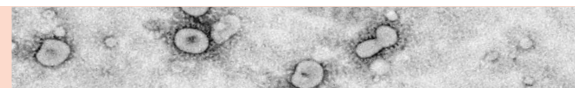
1. **Aita T, Kuwabara M, Murayama K, Sasagawa Y, Yabe S, Higuchi R, Tamura T, Miyazaki A, Tsunemitsu H.** 2012. Characterization of epidemic diarrhea outbreaks associated with bovine torovirus in adult cows. *Arch Virol* **157**:423-431.
2. **Almazan F, Galan C, Enjuanes L.** 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol* **78**:12683-12688.
3. **Alonso-Padilla J, Pignatelli J, Simon-Grife M, Plazuelo S, Casal J, Rodriguez D.** 2012. Seroprevalence of porcine torovirus (PToV) in Spanish farms. *BMC Res Notes* **5**:675.
4. **Anbalagan S, Peterson J, Wassman B, Elston J, Schwartz K.** 2014. Genome sequence of torovirus identified from a pig with porcine epidemic diarrhea virus from the United States. *Genome Announc* **2**.
5. **Angelini MM, Akhlaghpour M, Neuman BW, Buchmeier MJ.** 2013. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Proteins 3, 4, and 6 Induce Double-Membrane Vesicles. *mBio* **4**.
6. **Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT.** 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**:685-701.
7. **Beards GM, Hall C, Green J, Flewett TH, Lamouliatte F, Du Pasquier P.** 1984. An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles the Breda virus of calves. *Lancet* **1**:1050-1052.
8. **Beards GM, Brown DW, Green J, Flewett TH.** 1986. Preliminary characterisation of torovirus-like particles of humans: comparison with Berne virus of horses and Breda virus of calves. *J Med Virol* **20**:67-78.
9. **Beerens N, Selisko B, Ricagno S, Imbert I, van der Zanden L, Snijder EJ, Canard B.** 2007. De novo initiation of RNA synthesis by the arterivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **81**:8384-8395.
10. **Belov GA, Nair V, Hansen BT, Hoyt FH, Fischer ER, Ehrenfeld E.** 2012. Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* **86**:302-312.
11. **Bernasconi R, Molinari M.** 2011. ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. *Current Opinion in Cell Biology* **23**:176-183.
12. **Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ.** 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* **243**:240-246.
13. **Bolte S, Cordelières FP.** 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* **224**:213-232.
14. **Brockway SM, Clay CT, Lu XT, Denison MR.** 2003. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **77**:10515-10527.
15. **Calì T, Galli C, Olivari S, Molinari M.** 2008. Segregation and rapid turnover of EDEM1 by an autophagy-like mechanism modulates standard ERAD and folding activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **371**:405-410.
16. **Cornelissen LA, Wierda CM, van der Meer FJ, Herrewegh AA, Horzinek MC, Egberink HF, de Groot RJ.** 1997. Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus. *J Virol* **71**:5277-5286.
17. **Cottam EM, Maier HJ, Manifava M, Vaux LC, Chandra-Schoenfelder P, Gerner W, Britton P, Ktistakis NT, Wileman T.** 2011. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy* **7**:1335-1347.
18. **Chen Q, Fang L, Wang D, Wang S, Li P, Li M, Luo R, Chen H, Xiao S.** 2012. Induction of autophagy enhances porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication. *Virus Research* **163**:650-655.
19. **Cheng A, Zhang W, Xie Y, Jiang W, Arnold E, Sarafianos SG, Ding J.** 2005. Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* **335**:165-176.
20. **de Groot RJ.** 2006. Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconj J* **23**:59-72.

21. **de Groot RJ.** 2008. Chapter 9: Molecular Biology and Evolution of Torovirus, p. 133-146. *In* Perlman S, Gallagher T, Snijder EJ (ed.), Nidoviruses. ASM Press.
22. **de Wilde AH, Raj VS, Oudshoorn D, Bestebroer TM, van Nieuwkoop S, Limpens RW, Posthuma CC, van der Meer Y, Barcena M, Haagmans BL, Snijder EJ, van den Hoogen BG.** 2013. MERS-coronavirus replication induces severe in vitro cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon-alpha treatment. *J Gen Virol* **94**:1749-1760.
23. **Decroly E, Imbert I, Coutard B, Bouvet M, Selisko B, Alvarez K, Gorbalenya AE, Snijder EJ, Canard B.** 2008. Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. *J Virol* **82**:8071-8084.
24. **den Boon JA, Snijder EJ, Locker JK, Horzinek MC, Rottier PJ.** 1991. Another triple-spanning envelope protein among intracellularly budding RNA viruses: the torovirus E protein. *Virology* **182**:655-663.
25. **den Boon JA, Ahlquist P.** 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* **64**:241-256.
26. **Dong X, Levine B.** 2013. Autophagy and Viruses: Adversaries or Allies? *Journal of innate immunity* **5**:480-493.
27. **Draker R, Roper RL, Petric M, Tellier R.** 2006. The complete sequence of the bovine torovirus genome. *Virus Res* **115**:56-68.
28. **Dreux M, Chisari FV.** 2010. Viruses and the autophagy machinery. *Cell Cycle* **9**:1295-1307.
29. **Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L.** 1998. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology* **72**:8463-8471.
30. **Fagerland JA, Pohlenz JF, Woode GN.** 1986. A morphological study of the replication of Breda virus (proposed family Toroviridae) in bovine intestinal cells. *J Gen Virol* **67 (Pt 7)**:1293-1304.
31. **Fiala JC.** 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *Journal of Microscopy* **218**:52-61.
32. **Fontana J, López-Iglesias C, Tzeng W-P, Frey TK, Fernández JJ, Risco C.** 2010. Three-dimensional structure of Rubella virus factories. *Virology* **405**:579-591.
33. **Friesland M, Mingorance L, Chung J, Chisari FV, Gastaminza P.** 2013. Sigma-1 Receptor Regulates Early Steps of Viral RNA Replication at the Onset of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **87**:6377-6390.
34. **Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G, Pypaert M, Andersen J, Garcia-Sastre A, Munz C.** 2009. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* **6**:367-380.
35. **Garzon A, Maestre AM, Pignatelli J, Rejas MT, Rodriguez D.** 2006. New insights on the structure and morphogenesis of Berne virus. *Adv Exp Med Biol* **581**:175-180.
36. **Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM.** 2010. The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol* **84**:10438-10447.
37. **Goldsmith CS, Tatti KM, Ksiazek TG, Rollin PE, Comer JA, Lee WW, Rota PA, Bankamp B, Bellini WJ, Zaki SR.** 2004. Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerging infectious diseases* **10**:320-326.
38. **Gosert R, Kanjanahaluethai A, Egger D, Bienz K, Baker SC.** 2002. RNA Replication of Mouse Hepatitis Virus Takes Place at Double-Membrane Vesicles. *Journal of Virology* **76**:3697-3708.
39. **Gulacti I, Isidan H, Sozdutmaz I.** 2014. Detection of bovine torovirus in fecal specimens from calves with diarrhea in Turkey. *Arch Virol* **159**:1623-1627.
40. **Hagemeijer MC, Vonk AM, Monastyrska I, Rottier PJ, de Haan CA.** 2012. Visualizing coronavirus RNA synthesis in time by using click chemistry. *J Virol* **86**:5808-5816.
41. **Harak C, Lohmann V.** 2015. Ultrastructure of the replication sites of positive-strand RNA viruses. *Virology* **479-480**:418-433.
42. **Harcourt BH, Jukneliene D, Kanjanahaluethai A, Bechill J, Severson KM, Smith CM, Rota PA, Baker SC.** 2004. Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity. *J Virol* **78**:13600-13612.
43. **Haschek B, Klein D, Benetka V, Herrera C, Sommerfeld-Stur I, Vilcek S, Moestl K, Baumgartner W.** 2006. Detection of bovine torovirus in neonatal calf diarrhoea in Lower Austria and Styria (Austria). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**:160-165.



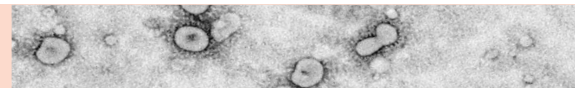
44. **Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A.** 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* **11**:1433-1437.
45. **Hoet AE, Saif LJ.** 2004. Bovine torovirus (Breda virus) revisited. *Anim Health Res Rev* **5**:157-171.
46. **Hoet EA, Linda JF.** 2008. Chapter 23: Torovirus Pathogenesis and Immune response, p. 351-359. *In* Perlman S, Gallagher T, Snijder EJ (ed.), *Nidoviruses*. ASM Press.
47. **Horzinek MC, Weiss M.** 1984. Toroviridae: a taxonomic proposal. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* **31**:649-659.
48. **Horzinek MC, Ederveen J, Weiss M.** 1985. The Nucleocapsid of Berne Virus. *Journal of General Virology* **66**:1287-1296.
49. **Horzinek MC, Ederveen J, Kaeffer B, de Boer D, Weiss M.** 1986. The peplomers of Berne virus. *J Gen Virol* **67 (Pt 11)**:2475-2483.
50. **Isackson P, Holland P, Simonsen A.** 2013. The role of ALFY in selective autophagy. *Cell death differ.* **20**:12-20.
51. **Itakura E, Mizushima N.** 2010. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6**:764-776.
52. **Ito T, Katayama S, Okada N, Masubuchi K, Fukuyama S, Shimizu M.** 2010. Genetic and antigenic characterization of newly isolated bovine toroviruses from Japanese cattle. *J Clin Microbiol* **48**:1795-1800.
53. **Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J.** 2004a. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol* **78**:5619-5632.
54. **Ivanov KA, Ziebuhr J.** 2004b. Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J Virol* **78**:7833-7838.
55. **Jackson WT, Giddings TH, Jr., Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, Kirkegaard K.** 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* **3**:e156.
56. **Jamieson FB, Wang EE, Bain C, Good J, Duckmanton L, Petric M.** 1998. Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen. *J Infect Dis* **178**:1263-1269.
57. **Johansen T, Lamark T.** 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**:279-296.
58. **Jordan TX, Randall G.** 2012. Manipulation or capitulation: virus interactions with autophagy. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **14**:126-139.
59. **Joubert PE, Meiffren G, Gregoire IP, Pontini G, Richetta C, Flacher M, Azocar O, Vidalain PO, Vidal M, Lotteau V, Codogno P, Rabourdin-Combe C, Faure M.** 2009. Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* **6**:354-366.
60. **Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T.** 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**:5720-5728.
61. **Kirisawa R, Takeyama A, Koiwa M, Iwai H.** 2007. Detection of bovine torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea in Japan. *J Vet Med Sci* **69**:471-476.
62. **Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, al. E.** 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**:445-544.
63. **Knoops K, Kikkert M, Worm SHEvd, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ.** 2008. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biol* **6**:e226.
64. **Knoops K, Swett-Tapia C, van den Worm SHE, te Velthuis AJW, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ, Kikkert M.** 2010. Integrity of the Early Secretory Pathway Promotes, but Is Not Required for, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus RNA Synthesis and Virus-Induced Remodeling of Endoplasmic Reticulum Membranes. *Journal of Virology* **84**:833-846.
65. **Knoops K, Barcena M, Limpens RW, Koster AJ, Mommaas AM, Snijder EJ.** 2012. Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures: reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis. *J Virol* **86**:2474-2487.

66. **Koonin EV.** 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **72** (Pt 9):2197-2206.
67. **Koopmans MP, Goosen ES, Lima AA, McAuliffe IT, Nataro JP, Barrett LJ, Glass RI, Guerrant RL.** 1997. Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children. *Pediatr Infect Dis J* **16**:504-507.
68. **Kopek BG, Perkins G, Miller DJ, Ellisman MH, Ahlquist P.** 2007. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. *PLoS Biol* **5**:e220.
69. **Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR.** 1996. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *Journal of Structural Biology* **116**:71-76.
70. **Krishnan T, Naik TN.** 1997. Electronmicroscopic evidence of torovirus like particles in children with diarrhoea. *Indian J Med Res* **105**:108-110.
71. **Kroneman A, Cornelissen LA, Horzinek MC, de Groot RJ, Egberink HF.** 1998. Identification and characterization of a porcine torovirus. *J Virol* **72**:3507-3511.
72. **Kudchodkar SB, Levine B.** 2009. Viruses and autophagy. *Rev Med Virol* **19**:359-378.
73. **Kuwabara M, Wada K, Maeda Y, Miyazaki A, Tsunemitsu H.** 2007. First isolation of cytopathogenic bovine torovirus in cell culture from a calf with diarrhea. *Clin Vaccine Immunol* **14**:998-1004.
74. **Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, Wu L, Kominami E, Ueno T, Yamamoto A, Federico M, Panganiban A, Vergne I, Deretic V.** 2009. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol* **186**:255-268.
75. **Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA.** 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**:759-774.
76. **Lauber C, Ziebuhr J, Junglen S, Drosten C, Zirkel F, Nga P, Morita K, Snijder E, Gorbalenya A.** 2012. Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Archives of Virology* **157**:1623-1628.
77. **Lee JY, Marshall JA, Bowden DS.** 1994. Characterization of Rubella Virus Replication Complexes Using Antibodies to Double-Stranded RNA. *Virology* **200**:307-312.
78. **Leib DA, Alexander DE, Cox D, Yin J, Ferguson TA.** 2009. Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 modulates herpes simplex virus type 1 pathogenesis through control of CD4+ T-cell responses. *J Virol* **83**:12164-12171.
79. **Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B.** 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**:672-676.
80. **Limpens RWAL, van der Schaar HM, Kumar D, Koster AJ, Snijder EJ, van Kuppeveld FJM, Bárcena M.** 2011. The Transformation of Enterovirus Replication Structures: a Three-Dimensional Study of Single- and Double-Membrane Compartments. *mBio* **2**.
81. **Lippai M, Lów P.** 2014. The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *BioMed Research International* **2014**:832704.
82. **Liu Q, Qin Y, Zhou L, Kou Q, Guo X, Ge X, Yang H, Hu H.** 2012. Autophagy sustains the replication of porcine reproductive and respiratory virus in host cells. *Virology* **429**:136-147.
83. **Lodha A, de Silva N, Petric M, Moore AM.** 2005. Human torovirus: a new virus associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* **94**:1085-1088.
84. **Lu Q, Yang P, Huang X, Hu W, Guo B, Wu F, Lin L, Kovacs AL, Yu L, Zhang H.** 2011. The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. *Developmental cell* **21**:343-357.
85. **Mackenzie JM, Jones MK, Young PR.** 1996. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology* **220**:232-240.
86. **Maestre AM, Garzón A, Rodríguez D.** 2011. Equine torovirus (BEV) induces caspase-mediated apoptosis in infected cells. *PLoS One* **6**:e20972.
87. **Maier HJ, Britton P.** 2012. Involvement of autophagy in coronavirus replication. *Viruses* **4**:3440-3451.
88. **Maier HJ, Cottam EM, Stevenson-Leggett P, Wilkinson JA, Harte CJ, Wileman T, Britton P.** 2013a. Visualizing the autophagy pathway in avian cells and its application to studying infectious bronchitis virus. *Autophagy*. **9**:496-509.



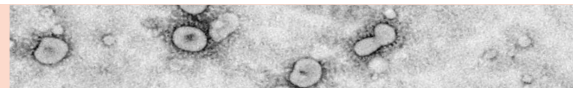
89. **Maier HJ, Hawes PC, Cottam EM, Mantell J, Verkade P, Monaghan P, Wileman T, Britton P.** 2013b. Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes. *MBio* **4**:e00801-00813.
90. **Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, Yoshimori T.** 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol* **190**:511-521.
91. **McBride R, van Zyl M, Fielding B.** 2014. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses* **6**:2991.
92. **Miller S, Krijnse-Locker J.** 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Micro* **6**:363-374.
93. **Miyinari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K.** 2007. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* **9**:1089-1097.
94. **Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y.** 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**:395-398.
95. **Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T.** 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152**:657-668.
96. **Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y.** 2003. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **35**:553-561.
97. **Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y.** 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology* **27**:107-132.
98. **Moloughney JG, Monken CE, Tao H, Zhang H, Thomas JD, Lattime EC, Jin S.** 2011. Vaccinia virus leads to ATG12-ATG3 conjugation and deficiency in autophagosome formation. *Autophagy* **7**:1434-1447.
99. **Monastyrska I, Ulasli M, Rottier PJ, Guan JL, Reggiori F, de Haan CA.** 2013. An autophagy-independent role for LC3 in equine arteritis virus replication. *Autophagy* **9**:164-174.
100. **Nakamoto M, Moy RH, Xu J, Bambina S, Yasunaga A, Shelly SS, Gold B, Cherry S.** 2012. Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in Drosophila. *Immunity* **36**:658-667.
101. **Netherton CL, Wileman T.** 2011. Virus factories, double membrane vesicles and viroplasm generated in animal cells. *Curr Opin Virol* **1**:381-387.
102. **Noack J, Bernasconi R, Molinari M.** 2014. How viruses hijack the ERAD tuning machinery. *J Virol* **88**:10272-10275.
103. **Nogales A, Galán C, Márquez-Jurado S, García-Gallo M, Kremer L, Enjuanes L, Almazán F.** 2011. Immunogenic characterization and epitope mapping of transmissible gastroenteritis virus RNA dependent RNA polymerase. *Journal of Virological Methods* **175**:7-13.
104. **Orenstein JM, Banach B, Baker SC.** 2008. Morphogenesis of Coronavirus HCoV-NL63 in Cell Culture: A Transmission Electron Microscopic Study. *Open Infect Dis J* **2**:52-58.
105. **Orvedahl A, Alexander D, Tallozy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, Burns D, Leib DA, Levine B.** 2007. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**:23-35.
106. **Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T.** 2007. p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **282**:24131-24145.
107. **Park SJ, Oh EH, Park SI, Kim HH, Jeong YJ, Lim GK, Hyun BH, Cho KO.** 2008. Molecular epidemiology of bovine toroviruses circulating in South Korea. *Vet Microbiol* **126**:364-371.
108. **Patterson GH, Lippincott-Schwartz J.** 2002. A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells. *Science* **297**:1873-1877.
109. **Pedersen KW, van der Meer Y, Roos N, Snijder EJ.** 1999. Open Reading Frame 1a-Encoded Subunits of the Arterivirus Replicase Induce Endoplasmic Reticulum-Derived Double-Membrane Vesicles Which Carry the Viral Replication Complex. *Journal of Virology* **73**:2016-2026.
110. **Pignatelli J, Jimenez M, Luque J, Rejas MT, Lavazza A, Rodriguez D.** 2009. Molecular characterization of a new PTOV strain. Evolutionary implications. *Virus Res* **143**:33-43.

111. **Pignatelli J, Grau-Roma L, Jimenez M, Segales J, Rodriguez D.** 2010a. Longitudinal serological and virological study on porcine torovirus (PToV) in piglets from Spanish farms. *Vet Microbiol* **146**:260-268.
112. **Pignatelli J, Jimenez M, Grau-Roma L, Rodriguez D.** 2010b. Detection of porcine torovirus by real time RT-PCR in piglets from a Spanish farm. *J Virol Methods* **163**:398-404.
113. **Pignatelli J, Alonso-Padilla J, Rodriguez D.** 2013. Lineage specific antigenic differences in porcine torovirus hemagglutinin-esterase (PToV-HE) protein. *Vet Res* **44**:126.
114. **Pohlenz JF, Cheville NF, Woode GN, Mokresh AH.** 1984. Cellular lesions in intestinal mucosa of gnotobiotic calves experimentally infected with a new unclassified bovine virus (Breda virus). *Veterinary pathology* **21**:407-417.
115. **Posthuma CC, Pedersen KW, Lu Z, Joosten RG, Roos N, Zevenhoven-Dobbe JC, Snijder EJ.** 2008. Formation of the arterivirus replication/transcription complex: a key role for nonstructural protein 3 in the remodeling of intracellular membranes. *J Virol* **82**:4480-4491.
116. **Pradesh U, Chikitsa PDDUP, Vishwa V, Dhircnci CrnrK, Izcitncigcir B.** 2014. Toroviruses affecting animals and humans: A review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* **9**:190-201.
117. **Prentice E, Jerome WG, Yoshimori T, Mizushima N, Denison MR.** 2004a. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* **279**:10136-10141.
118. **Prentice E, McAuliffe J, Lu X, Subbarao K, Denison MR.** 2004b. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J Virol* **78**:9977-9986.
119. **Raturi A, Simmen T.** 2013. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**:213-224.
120. **Reggiori F, Monastyrska I, Verheije MH, Cali T, Ulasli M, Bianchi S, Bernasconi R, de Haan CA, Molinari M.** 2010. Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* **7**:500-508.
121. **Reggiori F, de Haan CA, Molinari M.** 2011. Unconventional use of LC3 by coronaviruses through the alleged subversion of the ERAD tuning pathway. *Viruses* **3**:1610-1623.
122. **Richards AL, Jackson WT.** 2012. Intracellular vesicle acidification promotes maturation of infectious poliovirus particles. *PLoS Pathog* **8**:e1003046.
123. **Richards AL, Jackson WT.** 2013. How positive-strand RNA viruses benefit from autophagosome maturation. *J Virol* **87**:9966-9972.
124. **Robinson PA, Anderton BH, Loviny TLF.** 1988. Nitrocellulose-bound antigen repeatedly used for the affinity purification of specific polyclonal antibodies for screening DNA expression libraries. *Journal of Immunological Methods* **108**:115-122.
125. **Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, Santarella-Mellwig R, Habermann A, Hoppe S, Kallis S, Walther P, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2012. Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* **8**:e1003056.
126. **Romero-Brey I, Bartenschlager R.** 2014. Membranous Replication Factories Induced by Plus-Strand RNA Viruses. *Viruses* **6**:2826-2857.
127. **Roth-Cross JK, Stokes H, Chang G, Chua MM, Thiel V, Weiss SR, Gorbalenya AE, Siddell SG.** 2009. Organ-specific attenuation of murine hepatitis virus strain A59 by replacement of catalytic residues in the putative viral cyclic phosphodiesterase ns2. *J Virol* **83**:3743-3753.
128. **Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan K-L.** 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* **15**:741-750.
129. **Scott AC, Chaplin MJ, Stack MJ, Lund LJ.** 1987. Porcine torovirus? *Vet Rec* **120**:583.
130. **Schneider M, Ackermann K, Stuart M, Wex C, Protzer U, Schatzl HM, Gilch S.** 2012. Severe acute respiratory syndrome coronavirus replication is severely impaired by MG132 due to proteasome-independent inhibition of M-calpain. *J Virol* **86**:10112-10122.
131. **Schutze H, Ulferts R, Schelle B, Bayer S, Granzow H, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Ziebuhr J.** 2006. Characterization of White bream virus reveals a novel genetic cluster of nidoviruses. *J Virol* **80**:11598-11609.



132. **Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P.** 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular cell* **9**:505-514.
133. **Schwarz B, Routledge E, Siddell SG.** 1990. Murine coronavirus nonstructural protein ns2 is not essential for virus replication in transformed cells. *J Virol* **64**:4784-4791.
134. **Seybert A, Hegyi A, Siddell SG, Ziebuhr J.** 2000a. The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *RNA (New York, N.Y.)* **6**:1056-1068.
135. **Seybert A, van Dinten LC, Snijder EJ, Ziebuhr J.** 2000b. Biochemical characterization of the equine arteritis virus helicase suggests a close functional relationship between arterivirus and coronavirus helicases. *J Virol* **74**:9586-9593.
136. **Seybert A, Posthuma CC, van Dinten LC, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Ziebuhr J.** 2005. A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J Virol* **79**:696-704.
137. **Shelly S, Lukinova N, Bambina S, Berman A, Cherry S.** 2009. Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* **30**:588-598.
138. **Shi J, Luo H.** 2012. Interplay between the cellular autophagy machinery and positive-stranded RNA viruses. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **44**:375-384.
139. **Shi ST, Schiller JJ, Kanjanahaluethai A, Baker SC, Oh J-W, Lai MMC.** 1999. Colocalization and Membrane Association of Murine Hepatitis Virus Gene 1 Products and De Novo-Synthesized Viral RNA in Infected Cells. *Journal of Virology* **73**:5957-5969.
140. **Shin DJ, Park SI, Jeong YJ, Hosmillo M, Kim HH, Kim HJ, Kwon HJ, Kang MI, Park SJ, Cho KO.** 2010. Detection and molecular characterization of porcine toroviruses in Korea. *Arch Virol* **155**:417-422.
141. **Sims AC, Ostermann J, Denison MR.** 2000. Mouse Hepatitis Virus Replicase Proteins Associate with Two Distinct Populations of Intracellular Membranes. *Journal of Virology* **74**:5647-5654.
142. **Sinha S, Colbert CL, Becker N, Wei Y, Levine B.** 2008. Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy* **4**:989-997.
143. **Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH.** 2008. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **48**:1054-1061.
144. **Smits SL, van Vliet AL, Segeren K, el Azzouzi H, van Essen M, de Groot RJ.** 2005. Torovirus non-discontinuous transcription: mutational analysis of a subgenomic mRNA promoter. *J Virol* **79**:8275-8281.
145. **Smits SL, Snijder EJ, de Groot RJ.** 2006. Characterization of a torovirus main proteinase. *J Virol* **80**:4157-4167.
146. **Snijder EJ, den Boon JA, Bredenbeek PJ, Horzinek MC, Rijnbrand R, Spaan WJ.** 1990a. The carboxyl-terminal part of the putative Berne virus polymerase is expressed by ribosomal frameshifting and contains sequence motifs which indicate that toro- and coronaviruses are evolutionarily related. *Nucleic Acids Res* **18**:4535-4542.
147. **Snijder EJ, den Boon JA, Spaan WJ, Weiss M, Horzinek MC.** 1990b. Primary structure and post-translational processing of the Berne virus peplomer protein. *Virology* **178**:355-363.
148. **Snijder EJ, Horzinek MC, Spaan WJ.** 1990c. A 3'-coterminal nested set of independently transcribed mRNAs is generated during Berne virus replication. *J Virol* **64**:331-338.
149. **Snijder EJ, den Boon JA, Horzinek MC, Spaan WJ.** 1991a. Comparison of the genome organization of toro- and coronaviruses: evidence for two nonhomologous RNA recombination events during Berne virus evolution. *Virology* **180**:448-452.
150. **Snijder EJ, den Boon JA, Horzinek MC, Spaan WJ.** 1991b. Characterization of defective interfering RNAs of Berne virus. *J Gen Virol* **72 (Pt 7)**:1635-1643.
151. **Snijder EJ, Horzinek MC.** 1993. Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J Gen Virol* **74 (Pt 11)**:2305-2316.
152. **Snijder EJ, van Tol H, Roos N, Pedersen KW.** 2001. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex. *Journal of General Virology* **82**:985-994.

153. **Snijder EJ, van der Meer Y, Zevenhoven-Dobbe J, Onderwater JJ, van der Meulen J, Koerten HK, Mommaas AM.** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol* **80**:5927-5940.
154. **Stenglein MD, Jacobson ER, Wozniak EJ, Wellehan JFX, Kincaid A, Gordon M, Porter BF, Baumgartner W, Stahl S, Kelley K, Towner JS, DeRisi JL.** 2014. Ball Python Nidovirus: a Candidate Etiologic Agent for Severe Respiratory Disease in Python regius. *mBio* **5**.
155. **Stolz A, Ernst A, Dikic I.** 2014. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* **16**:495-501.
156. **Sun H, Lan D, Lu L, Chen M, Wang C, Hua X.** 2014. Molecular characterization and phylogenetic analysis of the genome of porcine torovirus. *Arch Virol* **159**:773-778.
157. **Sun MX, Huang L, Wang R, Yu YL, Li C, Li PP, Hu XC, Hao HP, Ishag HA, Mao X.** 2012. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces autophagy to promote virus replication. *Autophagy* **8**:1434-1447.
158. **Talloczy Z, Jiang W, Virgin HWt, Leib DA, Scheuner D, Kaufman RJ, Eskelinen EL, Levine B.** 2002. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:190-195.
159. **Tanida I.** 2011. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & redox signaling* **14**:2201-2214.
160. **Targett-Adams P, Boulant S, McLauchlan J.** 2008. Visualization of Double-Stranded RNA in Cells Supporting Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology* **82**:2182-2195.
161. **te Velthuis AJ, Arnold JJ, Cameron CE, van den Worm SH, Snijder EJ.** 2010. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res* **38**:203-214.
162. **Ulasli M, Verheije MH, de Haan CA, Reggiori F.** 2010. Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell Microbiol* **12**:844-861.
163. **Ulferts R, Ziebuhr J.** 2011. Nidovirus ribonucleases: Structures and functions in viral replication. *RNA Biology* **8**:295-304.
164. **van der Meer Y, van Tol H, Locker JK, Snijder EJ.** 1998. ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the arterivirus replication complex. *J Virol* **72**:6689-6698.
165. **van Hemert MJ, de Wilde AH, Gorbalenya AE, Snijder EJ.** 2008a. The in vitro RNA synthesizing activity of the isolated arterivirus replication/transcription complex is dependent on a host factor. *J Biol Chem* **283**:16525-16536.
166. **van Hemert MJ, van den Worm SH, Knoop K, Mommaas AM, Gorbalenya AE, Snijder EJ.** 2008b. SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. *PLoS Pathog* **4**:e1000054.
167. **van Vliet AL, Smits SL, Rottier PJ, de Groot RJ.** 2002. Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus. *EMBO J* **21**:6571-6580.
168. **Vazquez M-I, Rivas G, Cregut D, Serrano L, Esteban M.** 1998. The Vaccinia Virus 14-Kilodalton (A27L) Fusion Protein Forms a Triple Coiled-Coil Structure and Interacts with the 21-Kilodalton (A17L) Virus Membrane Protein through a C-Terminal α -Helix. *Journal of Virology* **72**:10126-10137.



169. **Verheije MH, Hagemeijer MC, Ulasli M, Reggiori F, Rottier PJ, Masters PS, de Haan CA.** 2010. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. *J Virol* **84**:11575-11579.
170. **Weiss M, Steck F, Horzinek MC.** 1983. Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (Berne virus). *J Gen Virol* **64 (Pt 9)**:1849-1858.
171. **Weiss M, Horzinek MC.** 1986. Morphogenesis of Berne virus (proposed family Toroviridae). *J Gen Virol* **67 (Pt 7)**:1305-1314.
172. **Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R.** 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* **5**:365-375.
173. **Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA.** 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of Virology* **71**:6650-6661.
174. **Westaway EG, Khromykh AA, Mackenzie JM.** 1999. Nascent Flavivirus RNA Colocalized in Situ with Double-Stranded RNA in Stable Replication Complexes. *Virology* **258**:108-117.
175. **Wirth M, Joachim J, Tooze SA.** 2013. Autophagosome formation—The role of ULK1 and Beclin1–PI3KC3 complexes in setting the stage. *Seminars in Cancer Biology* **23**:301-309.
176. **Wong J, Zhang J, Si X, Gao G, Mao I, McManus BM, Luo H.** 2008. Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *J Virol* **82**:9143-9153.
177. **Woode GN, Reed DE, Runnels PL, Herrig MA, Hill HT.** 1982. Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves. *Vet Microbiol* **7**:221-240.
178. **Xu X, Liu Y, Weiss S, Arnold E, Sarafianos SG, Ding J.** 2003. Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res* **31**:7117-7130.
179. **Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL.** 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**:1180-1185.
180. **Yu ZQ, Ni T, Hong B, Wang HY, Jiang FJ, Zou S, Chen Y, Zheng XL, Klionsky DJ, Liang Y, Xie Z.** 2012. Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* **8**:883-892.
181. **Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA.** 2006. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *Journal of Cell Science* **119**:259-270.
182. **Zhao Z, Thackray LB, Miller BC, Lynn TM, Becker MM, Ward E, Mizushima NN, Denison MR, Virgin HWt.** 2007. Coronavirus replication does not require the autophagy gene ATG5. *Autophagy* **3**:581-585.
183. **Zhou Y, Chen L, Zhu L, Xu Z.** 2013. Molecular detection of porcine torovirus in piglets with diarrhea in southwest China. *ScientificWorldJournal* **2013**:984282.